

GLEYSE FREIRE BONO

**INVESTIGAÇÃO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE A BUTIRILCOLINESTERASE E A
DOENÇA DE ALZHEIMER**

CURITIBA
2014

GLEYSE FREIRE BONO

**INVESTIGAÇÃO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE A BUTIRILCOLINESTERASE E A
DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lupe Furtado-Alle

CURITIBA
2014



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

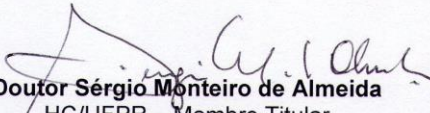


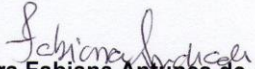
PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **GLEYSE FREIRE BONO**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

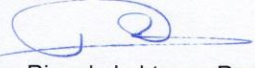
Curitiba, 29 de abril de 2014


Doutor Sérgio Monteiro de Almeida
HC/UFPR – Membro Titular


Doutora Fabiana Antunes de Andrade
UFPR – Membro Titular


Doutora Lupe Furtado Alle
Dep. Genética/UFPR – Orientadora e Presidente da Banca

Visto


Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

Prof^o Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza
Coordenador do PPG - GEN - UFPR
Matricula 176702

Pois a sabedoria entrará no teu coração, e o
conhecimento será aprazível à tua alma.

Provérbios 2.10

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é a principal causa de demência nos idosos. Patologicamente, é caracterizada pela presença de placas senis (PS) e emaranhados neurofibrilares (NFTs), os quais são formados devido ao acúmulo de peptídeo β -amiloide ($A\beta$) e de proteína *tau* hiperfosforilada (p-tau), respectivamente. Há também redução no número de neurônios e sinapses, com déficit colinérgico acentuado. O tratamento sintomático envolve o uso de inibidores das colinesterases (IChEs). A rivastigmina é um fármaco inibidor, tanto da acetilcolinesterase (AChE) como da butirilcolinesterase (BChE). A inibição pelos IChEs provoca aumento dos níveis de ACh na sinapse, melhorando a cognição. No cérebro dos pacientes com DA, a atividade da BChE está aumentada, sendo encontrada nas PS e nos NFTs. No plasma, essa enzima é encontrada em quatro formas moleculares: G4 (tetrâmero), G2 (dímero), G1 (monômero) e G1-ALB (monômero ligado à albumina). A atividade da BChE é influenciada por diversos fatores, entre eles o fenótipo *CHE2* C5+ e a variante *K* (BChE-K). A BChE-K têm sido investigada como um fator de risco para DA. O presente estudo visa avaliar a atividade total da butirilcolinesterase e relativa das formas moleculares G1, G1-ALB, G2 e G4 no plasma de 139 pacientes com DA provável e 139 idosos cognitivamente saudáveis, levando em consideração o fenótipo do loco *CHE2* e a variante *K* do gene *BCHE*; bem como determinar o efeito do tratamento com rivastigmina sobre essa enzima. Os principais resultados obtidos no estudo foram: 1) a atividade plasmática da BChE é significativamente menor nos pacientes com DA do que nos controles, sendo que a presença da doença é o principal fator que influencia nessa redução; 2) a atividade da BChE diminui com a progressão da doença; 3) a diminuição na atividade das formas moleculares da BChE não ocorreu de forma homogênea nos pacientes; 4) os pacientes do grupo CDR2 tratados com rivastigmina apresentaram redução significativa na atividade total e das formas moleculares da BChE quando comparados com os pacientes não tratados com esse fármaco; 5) a frequência do fenótipo *CHE2* C5+ foi semelhante em casos e controles; 6) não foi encontrada associação entre a variante *K* e a DA. Esses resultados indicam que a DA interfere na regulação da proporcionalidade das formas moleculares da BChE. Além disso, foi encontrado que a doença é o principal fator envolvido na diminuição da atividade da plasmática da BChE, assim como a evolução da doença atua reduzindo ainda mais a atividade da enzima nos pacientes. A redução significativa na atividade da BChE no grupo de pacientes com DA moderada sugere que esses indivíduos podem estar mais sujeitos aos efeitos colaterais decorrentes da inibição periférica dessa enzima. Os resultados do presente estudo sugerem que a atividade reduzida da butirilcolinesterase no plasma de pacientes com DA pode ser um potencial marcador secundário da progressão doença.

Palavras-chave: butirilcolinesterase, doença de Alzheimer, rivastigmina.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the major cause of dementia in the elderly. Pathologically, is characterized by the presence of senile plaques (SP) and neurofibrillary tangles (NFTs), which are formed due to the accumulation of β -amyloid peptide (A β) and hyperphosphorylated tau (tau-p), respectively. There is also a reduction in the number of neurons and synapses, with marked cholinergic deficit. The AD symptomatic treatment involves the use of cholinesterase inhibitors (ChEIs). Rivastigmine drug is either an inhibitor of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE). The inhibition of these enzymes by ChEIs increased ACh levels at the synapse, improving cognition. BChE activity increases in AD brain patients, and is also found in SP and NFTs. In plasma, this enzyme is found in four main molecular forms: G4 (tetramer), G2 (dimer), G1 (monomer) and G1-ALB (monomer linked to albumin). BChE activity is influenced by several factors, including the *CHE2* C5+ phenotype and *K* variant (BChE-K). The BChE-K has been investigated as a risk factor for AD. The present study aims to assess the total and relative activity molecular forms G1, G1-ALB, G2 and G4 of butyrylcholinesterase in the plasma of 139 patients with probable AD and 139 cognitively healthy elderly, taking into account the locus *CHE2* phenotype and *K* variant of *BCHE* gene; and to determine the effect of rivastigmine treatment on this enzyme. The main results obtained in the study were: 1) the plasma BChE activity is significantly lower in AD patients than in controls, and the disease itself is the major factor influencing this reduction; 2) BChE activity declines with disease progression; 3) the decrease in the activity of BChE molecular forms did not occur homogeneously in patients; 4) the patients of CDR2 group rivastigmine treated showed a significant reduction in total and molecular forms plasma BChE activity when compared with no-rivastigmine treated patients; 5) the frequency of the *CHE2* C5+ phenotype was similar in cases and controls; 6) found no association between the *K* variant and AD. These results indicate that AD interferes in regulating proportionality of BChE molecular forms. Furthermore, the disease is a major factor in the BChE activity decrease, as well as the evolution of the disease acts further reducing the enzyme activity in patients. A significant reduction in the activity of BChE in patients with moderate AD suggests that these individuals may be more susceptible to side effects due to peripheral inhibition of this enzyme. The results of this study suggest that the reduced activity of butyrylcholinesterase in the AD patients plasma may be a secondary potential marker of disease progression.

Keywords: butyrylcholinesterase, Alzheimer's disease, rivastigmine.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Emaranhados neurofibrilares do córtex da paciente Auguste D. desenhados por Alois Alzheimer em 1911.	10
Figura 2. O cérebro afetado pela doença de Alzheimer.	12
Figura 3. Placa neurítica coloração pela prata e numerosas placas neuríticas (direita).	13
Figura 4. Novelo neurofibrilar coloração pela prata e numerosos emaranhados neurofibrilares	13
Figura 5. Hipótese da Cascata do Amiloide no processo patológico da doença de Alzheimer.	14
Figura 6. Dinâmica dos biomarcadores na cascata patológica da doença de Alzheimer.	16
Figura 7. Estrutura química dos inibidores de colinesterases.	20
Figura 8. O equilíbrio entre o processamento e a eliminação da APP na doença de Alzheimer.	28
Figura 9. Vias implicadas na doença de Alzheimer.	29

Figura 10. Estrutura do gene APOE humano.	31
Figura 11. Diferenças estruturais entre a apoE4 e a apoE3.	33
Figura 12. Vias de síntese, liberação e hidrólise da acetilcolina em uma terminação nervosa colinérgica.	35
Figura 13. Formas moleculares da butirilcolinesterase.	40
Figura 14. Superposição da BChE nativa, TcAChE e a AChE de <i>Drosophila melanogaster</i> na região da entrada do sítio ativo.	41
Figura 15. Desenho esquemático do gene BCHE mostrando o número de pares de bases de cada um dos quatro exons.	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
3 JUSTIFICATIVA	5
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
4.1 DEMÊNCIAS	6
4.1.1 Diagnóstico de demência	7
4.2 COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE	9
4.3 A DOENÇA DE ALZHEIMER	10
4.3.1 Aspectos gerais da Doença de Alzheimer	10
4.3.2 Neuropatologia da Doença de Alzheimer	11
4.3.3 Diagnóstico da Doença de Alzheimer	16
4.3.4 Tratamento da doença de Alzheimer	18
4.3.4.1 Inibidores das Colinesterases	19
4.3.4.2 Antagonistas dos Receptores Glutamatérgicos	23
4.3.4.3 Outras Estratégias Farmacoterapêuticas	24
4.3.5 A genética na Doença de Alzheimer	26
4.3.5.1 O gene <i>APOE</i>	30
4.3.5.2 A apolipoproteína E	32
4.4 COLINESTERASES	35
4.4.1 A Butirilcolinesterase	37
4.4.1.1 Estrutura Bioquímica da Butirilcolinesterase Humana	39
4.4.2 O gene <i>BCHE</i>	42
4.4.2.1 Variabilidade do Gene <i>BCHE</i>	44
4.4.3 O loco <i>CHE2</i>	46
4.5 A DOENÇA DE ALZHEIMER E A BUTIRILCOLINESTERASE HUMANA	47
4.5.1 A doença de Alzheimer e a variante <i>K</i> do gene <i>BCHE</i>	48
5 ARTIGO	51
6 DISCUSSÃO GERAL	68
7 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS	73
APÊNDICE	87

MATERIAL E MÉTODOS-----	87
Amostras -----	87
Eletroforese em gel de ágar ácido – Fenotipagem do loco <i>CHE2</i> -----	88
Medida da Atividade Enzimática da BChE -----	88
Eletroforese em gel de poliacrilamida – Determinação das Formas Moleculares da BChE -----	89
ANEXOS-----	91

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é a causa mais comum de demência, sendo responsável por 60-80% de todas as demências. A DA causa grande sofrimento para o paciente, levando a estresse emocional e sintomas comportamentais (WILLIAMS *et al.*, 2010). O déficit de memória para fatos recentes é o sintoma mais frequente nas demências e bem característico das fases iniciais da maioria dos casos de doença de Alzheimer (BRUCKI *et al.*, 2011). As principais alterações patológicas que são observadas no tecido cerebral afetado pela DA são os elevados níveis de peptídeo β -amiloide ($A\beta$) formando as placas senis, e também da proteína *tau* hiperfosforilada (*p-tau*) de montagem dos microtúbulos, a qual se acumula como emaranhados neurofibrilares (NFTs) (REITZ *et al.*, 2011).

De acordo com o padrão genético, a DA é dividida em dois tipos: familiar, com herança Mendeliana e predominantemente de início precoce (antes dos 60 anos de idade) conhecida como *early-onset familial AD* (EOFAD) e esporádica, com menor ou nenhuma agregação familiar, ocorrendo geralmente mais tardiamente (após os 60 anos de idade) a *late-onset AD* (LOAD) (BERTRAM *et al.*, 2010).

Entre os estudos de associação genética, o alelo *APOE* $\epsilon 4$ do gene *APOE* foi reconhecido como um fator de risco para DA, em especial de início tardio (COON *et al.*, 2007). Mutações nos genes da proteína precursora do amiloide (*APP*), presenilina-1 (*PSEN1*) e presenilina-2 (*PSEN2*), os quais codificam proteínas envolvidas na geração de β -amiloide, foram implicadas na patologia da doença de Alzheimer de início precoce (REITZ *et al.*, 2011).

O tratamento farmacológico para a DA envolve principalmente a utilização de inibidores das colinesterases (galantamina, donepezil e rivastigmina) nas fases leve a moderada, e antagonistas glutamatérgicos de receptores NMDA (memantina) nas fases moderada a grave da doença (ENGELHARDT *et al.*, 2005). O uso de anticolinesterásicos, apesar de não impedir a progressão da doença, gera melhora das manifestações clínicas dos pacientes com DA, em especial na esfera cognitiva (PARNETTI, 2007). A acetilcolinesterase constitui o alvo primário dos inibidores das colinesterases (donepezil e galantamina), mas ambas enzimas, AChE e BChE, podem ser inibidas (rivastigmina). A inibição simultânea da BChE pela rivastigmina pode eventualmente prolongar o benefício do tratamento (ENGELHARDT *et al.*, 2005).

A butirilcolinesterase (BChE) é uma enzima codificada pelo gene *BCHE* (3q26.1-q26.2) sintetizada no fígado e amplamente distribuída (WESCOE *et al.*, 1947). Experimentos sugerem que a AChE não é necessária para o estabelecimento das vias colinérgicas e que a BChE pode substituir essa enzima ao exercer a função de hidrólise de acetilcolina no cérebro normal (MESULAM *et al.*, 2002). A atividade da butirilcolinesterase (BChE) aumenta a partir dos 60 anos de idade e também no cérebro com doença de Alzheimer (LEHMANN *et al.*, 1997). Reatividade maior da BChE foi observada em placas senis da doença de Alzheimer, sugerindo que a BChE poderia facilitar a formação da placa senil da doença (BIZZARRO *et al.*, 2010).

Em humanos, há quatro formas principais da BChE: G₁, G₂, G₃ e G₄, de acordo com o número de subunidades moleculares. A G₁ corresponde forma globular monomérica. G₂ corresponde ao dímero, G₃ ao trímero e G₄ diz respeito ao tetrâmero (Masson, 1989). Harris *et al.* (1963a) identificaram uma banda denominada C₅ determinada pelo gene *BCHE* e pelo loco *CHE2*. O loco *CHE2* apresenta os alelos *CHE2 C5+* e *CHE2 C5-* que indicam presença e a ausência da banda respectivamente (HARRIS *et al.*, 1963b). Indivíduos com o fenótipo *CHE2 C5+* apresentam atividade média da BChE cerca de 30% mais elevada que a atividade em indivíduos *CHE2 C5-* (HARRIS, 1980).

A variante K da enzima BChE (BChE-K) é caracterizada pela substituição de alanina por treonina na posição C-terminal 539 (BARTELS *et al.*, 1992). Há resultados controversos em relação à associação da variante K com o risco para DA. Alguns autores relatam sinergismo entre a BChE-K e o alelo *APOE ε4* para aumentar o risco de DA (RAYGANI *et al.*, 2004; LEHMANN *et al.*, 1997), enquanto outros sugerem efeito protetor dessa variante (BIZZARRO *et al.*, 2010). Há também estudos que sugerem a possibilidade de ambos os efeitos, protetor e de risco, devido a consequente redução na atividade hidrolítica e dificuldade para amenizar a formação de Aβ pela BChE-K, respectivamente (PODOLY *et al.*, 2009). Outros trabalhos, no entanto, não encontraram nenhuma associação entre a variante K e o risco de doença de Alzheimer (SINGLETON *et al.*, 1998; GRUBBER *et al.*, 1999; YAMAMOTO *et al.*, 1999).

O presente trabalho visa investigar a associação entre a doença de Alzheimer e a butirilcolinesterase, visto que há controvérsias sobre o papel dessa enzima no

sistema colinérgico periférico, na patologia da doença de Alzheimer e também no tratamento com fármacos inibidores de colinesterases. Essa investigação foi feita analisando as formas moleculares e a atividade dessa enzima no plasma de pacientes com DA e em controles idosos. Outros parâmetros como a variante *K* do gene *BCHE*, assim como as variantes do loco *CHE2* também foram determinadas já que são previamente conhecidas como fatores que interferem na atividade da BChE.

Como determinado pelo Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPR, esse trabalho está estruturado da seguinte forma: objetivos (gerais e específicos); justificativa; revisão bibliográfica; artigo; discussão geral, conclusões e referências bibliográficas. O artigo denominado “*Butyrylcholinesterase: K variant, plasma activity, molecular forms and rivastigmine treatment in Alzheimer’s disease*” abrange todos os resultados obtidos no estudo, sendo composto por *abstract, introduction, materials and methods, results, discussion* e *references* e está formatado de acordo com o periódico pretendido. A discussão geral abrange os resultados e discussão como um todo e de modo mais amplo que o artigo, assim como as conclusões. Os materiais e métodos utilizados na pesquisa estão descritos de forma detalhada no Apêndice. Os Anexos compreendem parte do material utilizado na pesquisa .

2. OBJETIVOS

Geral

Avaliar a atividade total da butirilcolinesterase e relativa das formas moleculares G1, G1-ALB, G2 e G4 no plasma de pacientes com doença de Alzheimer e em controles idosos, levando em consideração o fenótipo do loco *CHE2* e a variante *K* do gene *BCHE*; bem como determinar o efeito do tratamento com rivastigmina sobre essa enzima.

Específicos

- 1) Determinar as formas moleculares da enzima butirilcolinesterase nos pacientes com doença de Alzheimer e nos controles;
- 2) Realizar a fenotipagem do loco *CHE2* nos pacientes com doença de Alzheimer e nos controles;
- 3) Avaliar a atividade total e relativa das formas moleculares (G1, G1-ALB, G2 e G4) da butirilcolinesterase nos pacientes com doença de Alzheimer e nos controles;
- 4) Investigar associação entre os dados do presente estudo, conjuntamente com dados de genotipagem da variante *K* do gene *BCHE* realizados em outro projeto do grupo, e a doença de Alzheimer;
- 5) Determinar o efeito do tratamento com rivastigmina sobre a atividade total e relativa das formas moleculares da BChE no grupo de pacientes em diferentes estágios de evolução da doença de Alzheimer.

3. JUSTIFICATIVA

A doença de Alzheimer é a principal causa de demência e a sua patogênese ainda possui alguns mecanismos desconhecidos. No âmbito genético, os genes *APP*, *PSEN1* e *PSEN2* já foram bem caracterizados para a ocorrência de DA precoce e familiar. No entanto, para a DA esporádica e mais frequente, vários genes já foram investigados, sendo que o alelo *APOE ε4* do gene *APOE* é considerado o principal fator de risco genético. A variante *K* do gene *BCHE* também já foi associada como o risco para DA. Entretanto, a associação entre a BChE e a DA ainda revela controvérsias, principalmente no que se refere a expressão e atividade hidrolítica da enzima. Visto a necessidade de elucidar essa associação, o presente trabalho analisou parâmetros como atividade da enzima BChE e suas respectivas formas moleculares, assim como o fenótipos do loco *CHE2* e a variante *K* em pacientes com DA e em controles idosos cognitivamente saudáveis.

Outra dificuldade para os pacientes com DA diz respeito ao tratamento. Os inibidores de colinesterases (donepezil, rivastigmina e galantamina) são fármacos de primeira escolha para o tratamento da doença. A rivastigmina é um inibidor de dupla ação capaz de inibir tanto a AChE quanto a BChE, periférica e centralmente. Na prática clínica, há evidente divergência na resposta dos pacientes a essas drogas. A inibição periférica das colinesterases está relacionada com o aparecimento dos efeitos colaterais. Dessa forma, o estudo também visa investigar o efeito do tratamento com rivastigmina sobre a atividade da butirilcolinesterase e sobre as formas moleculares dessa enzima nos diferentes estágios de evolução da DA.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 DEMÊNCIAS

A prevalência global de demências é estimada em mais de 24 milhões de indivíduos e está prevista para dobrar a cada 20 anos até 2040 (REITZ *et al.*, 2011). A demência é caracterizada pelo declínio cognitivo persistente que pode interferir nas atividades sociais ou profissionais do indivíduo, resultando em perda da independência. A demência é causada por uma doença ou processo que acomete o sistema nervoso central, podendo ser reversível com o tratamento da doença específica que a causa, embora na maioria das vezes seja irreversível. Normalmente possui evolução lenta e progressiva, mas pode ocorrer de modo agudo ou subagudo, não progressiva, como nas formas de demência vascular ou pós-traumática (BRUCKI *et al.*, 2011).

A doença de Alzheimer (DA) é a causa mais comum de demência, sendo responsável por 60-80% de todas as demências. O principal fator de risco para DA é a idade. A prevalência da doença dobra a cada cinco anos após os 65 anos de idade (WILLIAMS *et al.*, 2010). Com isso, o aumento constante da expectativa de vida da população mundial está se tornando um problema social importante. No entanto, além da idade, a prevalência das demências também é influenciada por fatores como escolaridade e nível socioeconômico (HERRERA *et al.*, 2002).

Herrera *et al.* (2002) em estudo realizado na cidade de Catanduva do interior de São Paulo, encontram prevalência de demência de 7,1% nos idosos com idade superior ou igual a 65 anos. Neste estudo, a prevalência aumentava com o aumento da idade. Bottino *et al.* (2008) em outro estudo na cidade de São Paulo, relatou que a prevalência observada em idosos acima de 60 anos foi de 6,8%. A doença de Alzheimer (DA) foi a causa mais frequente de demência observada (59,8%), seguida pela demência vascular (15,9%). Em levantamento feito em três bases de dados por Lopes *et al.* (2007) entre os anos de 1994 a 2000, a DA foi a principal causa de demência em todas as regiões. Porém, em 30% dos estudos asiáticos, houve predomínio da demência vascular (DV) sobre a DA.

A demora no diagnóstico das demências é uma das principais dificuldades relativa a essa condição. Tal fato está relacionado à falta de atenção aos sintomas,

pelos pacientes, familiares ou até pelos médicos e também devido à existência de outras doenças que podem apresentar sintomas cognitivos (BRUCKI *et al.*, 2011).

Estudo conduzido por Nitrini *et al.* (2005) concluiu que a demência provoca redução significativa na sobrevivência e revelou que os diagnósticos de demência ou de DA são raramente relatados nos atestados de óbito do Brasil.

Embora haja grande quantidade de idosos que desenvolvem quadro demencial e que não são diagnosticados, estima-se que há 1.200.000 indivíduos com doença de Alzheimer no Brasil. Uma das razões para essa discrepância é a escassez de profissionais qualificados para fazer o diagnóstico correto das demências (ATALAIA-SILVA *et al.*, 2008).

4.1.1 Diagnóstico de demência

Os critérios para o diagnóstico de demência do *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV* (DSM-IV) exigiam o comprometimento da memória. Porém, esses critérios foram revistos pelo *National Institute on Aging* (NIA) e *Alzheimer's Association* (AA) já que há casos de demências em que não ocorre, em fases iniciais, o comprometimento desse domínio cognitivo como demência frontotemporal, demência vascular e demência com corpos de Lewy. Tais critérios são os recomendados para a aplicação no Brasil pela Academia Brasileira de Neurologia (FROTA *et al.*, 2011). Em 2013, a American Psychiatric Association (APA) lançou a quinta edição do DSM, o DSM-V. Entre as atualizações propostas no manual, há a mudança do termo demência para Transtorno Neurocognitivo Maior e a alteração nos critérios para diagnóstico de demência, não exigindo mais o comprometimento da memória para o diagnóstico possibilitando a aplicação em outras etiologias (APA, 2013).

A demência é diagnosticada quando há sintomas cognitivos e comportamentais (neuropsiquiátricos) que (FROTA *et al.*, 2011):

1. Interferem nas habilidades profissionais ou atividades rotineiras;
2. Representam um declínio em relação ao desempenho funcional prévio;
3. Não podem ser explicados por *delirium* ou transtorno psiquiátrico maior.

O comprometimento cognitivo é detectado e diagnosticado através da combinação da anamnese com o paciente e um informante que tenha conhecimento sobre o histórico e uma avaliação cognitiva objetiva com um exame breve do estado

mental ou avaliação neuropsicológica. Tal comprometimento cognitivo ou comportamental envolve no mínimo dois dos seguintes domínios (FROTA *et al.*, 2011):

1. Memória. Diminuição na capacidade de adquirir ou lembrar informações.
2. Função executiva. Comprometimento no raciocínio, na execução de tarefas complexas e no julgamento.
3. Habilidade visuoespacial. Incapacidade de reconhecer rostos ou objetos comuns, encontrar objetos, manusear utensílios ou vestir-se mesmo com boa acuidade visual.
4. Funções de linguagem (fala, escrita, leitura). Dificuldade para falar, escrever, encontrar ou compreender palavras.
5. Personalidade. Comportamento alterado, flutuações de humor, apatia, motivação prejudicada, diminuição do interesse, atitudes sociais inaceitáveis.

A diferenciação entre demência e Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) baseia-se na determinação se há ou não interferência significativa nas habilidades profissionais ou atividades rotineiras habituais do indivíduo. Trata-se de um julgamento clínico obtido por um médico especialista com base na avaliação individual do paciente levando em conta a descrição dos seus hábitos diários descritos pelo próprio paciente e por um informante com o conhecimento do histórico (MCKHANN *et al.*, 2011). Indivíduos com CCL possuem risco aumentado para o desenvolvimento de demência, sendo estimado que 10-15% desses pacientes evoluem para um quadro demencial por ano (PETERSEN, 2004).

A avaliação cognitiva dos pacientes é geralmente iniciada a partir de testes de rastreio como o Mini-Exame do Estado Mental (MEEM) (FOLSTEIN *et al.*, 1975) e complementada com testes que avaliam diferentes componentes do funcionamento cognitivo (CARAMELLI; BARBOSA, 2002). Recentemente, o também teste de rastreio conhecido como MoCA, The Montreal Cognitive Assessment, desenvolvido por Nasreddine *et al.* (2005) foi validado para a sua aplicação no Brasil (MEMÓRIA *et al.*, 2013).

A avaliação neuropsicológica detalhada é recomendada especialmente nos estágios iniciais de demência em que os testes de rastreio apresentam-se normais e

também se faz importante no diagnóstico diferencial das demências (CARAMELLI; BARBOSA, 2002).

Escalas como PFEFFER (PFEFFER *et al.*, 1982) e Índice de Katz (KATZ *et al.*, 1970) são ferramentas que auxiliam na avaliação do desempenho do paciente nas atividades de vida diária (LAWTON; BRODY, 1969).

Para classificar o grau de demência utiliza-se o *Clinical Dementia Rating* (CDR) desenvolvido inicialmente por Hughes *et al.* (1982) e adaptado por Morris (1993), o qual abrange as seguintes categorias: *nenhum*, *questionável*, *leve*, *moderada* e *grave*.

Exames laboratoriais incluindo hemograma, níveis sérios de vitamina B12, reação sorológica para sífilis, função tiroidiana, hepática e renal, são obrigatórios na investigação etiológica da demência (KNOPMAN *et al.*, 2001) e permitem identificar as causas potencialmente reversíveis.

Os exames de neuroimagem estrutural (tomografia ou ressonância magnética do crânio) podem revelar alterações vasculares sugestivas para algumas demências ou também outras condições como tumores e hidrocefalia, auxiliando no diagnóstico (CARAMELLI; BARBOSA, 2002).

4.2 COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE

O comprometimento cognitivo leve (CCL) ou *mild cognitive impairment* (MCI) é definido como uma síndrome em que o indivíduo apresenta declínio cognitivo maior do que o esperado para a idade e nível de escolaridade, mas que não interfere nas suas atividades diárias (GAUTHIER *et al.*, 2006). Em contextos clínicos, onde a disfunção cognitiva é mais provável de ser detectada, o comprometimento cognitivo leve revelou-se útil para definir os indivíduos que estão em risco para desenvolver a doença de Alzheimer (REITZ *et al.*, 2011).

Há dois tipos essenciais de CCL, os quais são definidos conforme o envolvimento ou não da memória no quadro clínico: o CCL amnésico (CCLa) e o CCL não amnésico (CCLna). O prejuízo na memória pode ser resultante não somente de um processo neurodegenerativo, mas também devido à ocorrência de isquemia, trauma, distúrbios metabólicos, doenças psiquiátricas e diversas condições sistêmicas como insuficiência cardíaca ou doença pulmonar (BRUCKI *et al.*, 2011). Estudo de Lehrner *et al.* (2005) revelou que os pacientes com CCLa

possuem probabilidade 8,6 vezes maior de desenvolver DA quando comparado com pacientes sem comprometimento evidente de memória em testes neuropsicológicos. Outro estudo de Morris *et al.* (2001) encontrou que muitos indivíduos com CCL progridem para estágios mais avançados de demência e geralmente possuem características neuropatológicas da DA, concluindo que muitas vezes o CCL pode representar um estágio inicial da doença de Alzheimer.

4.3 A DOENÇA DE ALZHEIMER

4.3.1 Aspectos gerais da doença de Alzheimer

O médico Alois Alzheimer nasceu no dia 14 de junho de 1864, em Marktbreit, Alemanha, e estudou medicina nas universidades de Berlin, Tübingen e Würzburg. Em 1888 iniciou sua carreira médica como residente no hospital para doentes mentais e epiléticos, Frankfurt am Main, sendo depois promovido a médico sênior. Em 1901, Alzheimer examinou a senhora Auguste D. no hospital Frankfurt. A paciente de 51 anos apresentava compreensão reduzida, déficit de memória, desorientação, paranoia, alucinações auditivas e comportamento imprevisível. Com a morte de Auguste D. em 1906, Alzheimer estudou as características neuropatológicas da doença e descreveu os achados como alterações neurofibrilares (Figura 1), hoje conhecidas como emaranhados neurofibrilares e placas neuríticas. Emil Kraepelin, diretor da Clínica Psiquiátrica Real de Munique, onde Alzheimer trabalhou, introduziu o epônimo “doença de Alzheimer” na 8ª edição de seu livro “Manual de Psiquiatria”, em 1910 (MAURER *et al.*, 1997).



Figura 1 – Emaranhados neurofibrilares do córtex da paciente Auguste D. desenhados por Alois Alzheimer em 1911 (MAURER *et al.*, 1997).

A doença de Alzheimer é uma doença cerebral irreversível e progressiva, que lentamente destrói a memória e habilidades de pensamento podendo também afetar a capacidade de realizar as tarefas mais simples da vida diária. Na maioria das pessoas com DA, os sintomas aparecem pela primeira vez depois de 60 anos de idade, sendo a causa mais comum de demência nos idosos (NIH, 2012) e mais prevalente em mulheres do que em homens (GATZ *et al.*, 2006). Na América Latina, a prevalência total da doença é semelhante a encontrada em países desenvolvidos, 7,1%, no entanto, ocorre mais precocemente, entre 65 e 69 anos, sendo mais prevalente em analfabetos (Nitrini *et al.*, 2009).

O déficit de memória para fatos recentes é o sintoma mais frequente nas demências e é bem característico das fases iniciais da maioria dos casos da doença de Alzheimer. A redução na capacidade de memorização da DA ocorre devido ao processo degenerativo com presença de emaranhados neurofibrilares, perda de sinapses e de neurônios predominantemente no córtex entorrinal e no hipocampo (BRUCKI *et al.*, 2011).

4.3.2 Neuropatologia da Doença de Alzheimer

A DA é uma doença neurodegenerativa que se caracteriza, do ponto de vista macroscópico, por atrofia predominantemente cortical, sendo mais acentuada no lobo temporal, principalmente na formação do hipocampo, somado ao aumento difuso dos sulcos e fissuras corticais devido à redução dos giros (Figura 2). As áreas corticais límbicas, paralímbicas e do córtex de associação são as mais comprometidas desde os estágios iniciais da doença, já o córtex motor, o visual e o auditivo, por exemplo, são afetados na fase mais avançada da doença (BRUCKI *et al.*, 2011).

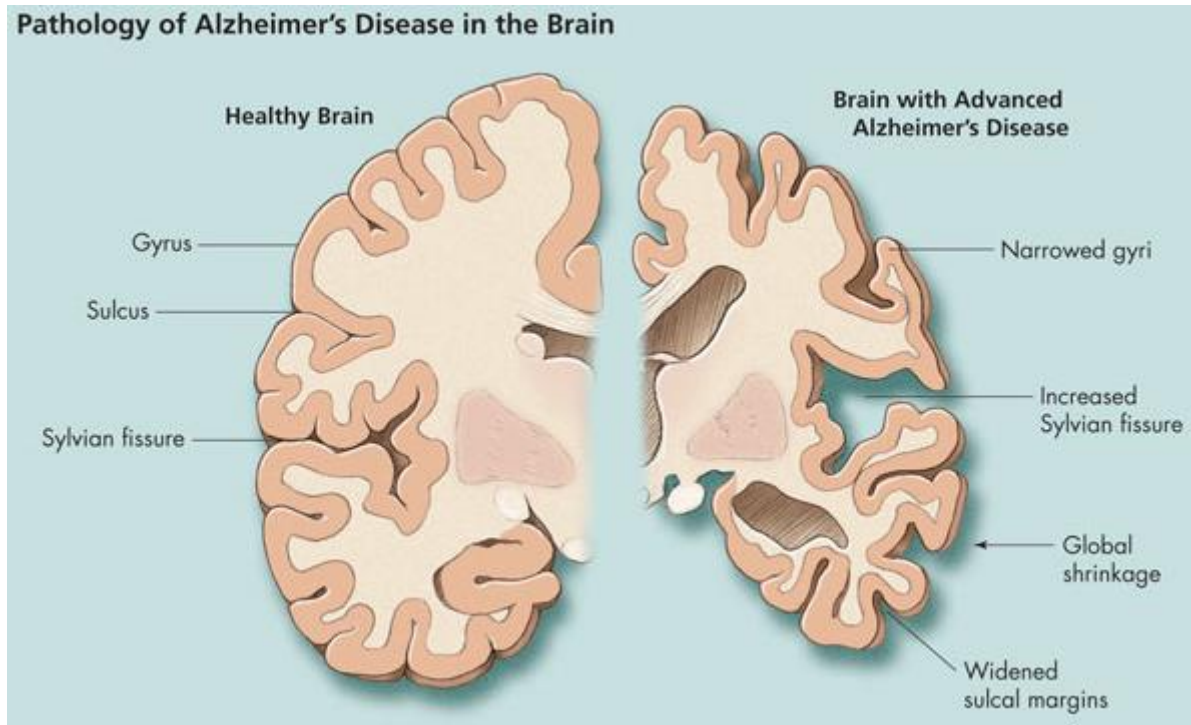


Figura 2 – O cérebro afetado pela doença de Alzheimer sofre redução global de tamanho com sulcos ampliados, estreitamento dos giros e fissura de Sylvian alargada. Disponível em: <<http://www.healthplexus.net/article/neurobiology-aging>>. Acesso em 26/03/2014.

Microscopicamente, ocorre uma redução no número de neurônios e de sinapses somados a duas alterações características da doença: as placas senis (Figura 3) e os emaranhados neurofibrilares (NFTs) (Figura 4), os quais são formados devido aos elevados níveis de peptídeo β -amiloide ($A\beta$) depositado extracelularmente e ao acúmulo intracelular de proteína *tau* hiperfosforilada (p-tau), respectivamente (REITZ *et al.*, 2011). As placas senis (PS) podem apresentar propriedades neurotóxicas conforme o seu tipo e a sua estrutura. As placas senis difusas compostas basicamente de dendritos e fibrilas de $A\beta$ apresentam pouca ação tóxica, enquanto que as placas senis neuríticas compostas de neuritos distróficos são altamente tóxicas e prevalentes na doença de Alzheimer (BRUCKI *et al.*, 2011). De fato, foi verificado que as placas senis difusas estão usualmente presentes no cérebro de idosos cognitivamente saudáveis, enquanto que as placas distróficas são mais frequentemente encontradas em pacientes com DA (SERRANO-POZO *et al.*, 2011). As regiões cerebrais com maior presença das placas senis são o córtex entorrinal e o hipocampo, regiões envolvidas no aprendizado e memória (BRUCKI *et al.*, 2011). Os emaranhados neurofibrilares por sua vez, estão

distribuídos principalmente no córtex límbico e de associação (SERRANO-POZZO *et al.*, 2011).

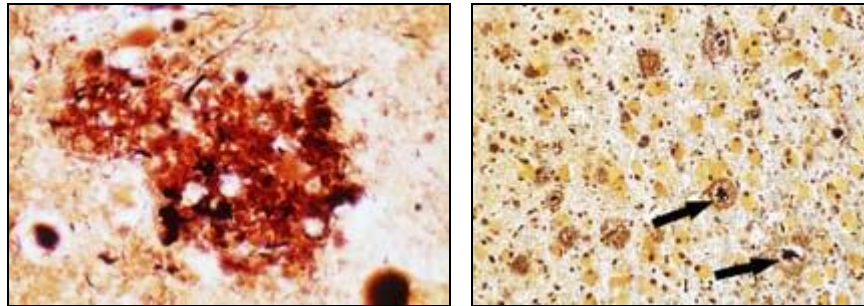


Figura 3 – Placa neurítica coloração pela prata (esquerda) e numerosas placas neuríticas (direita). Disponível em <<http://www.alzheimermed.com.br/conceitos/neuropatologia>>. Acesso em 27/09/12.

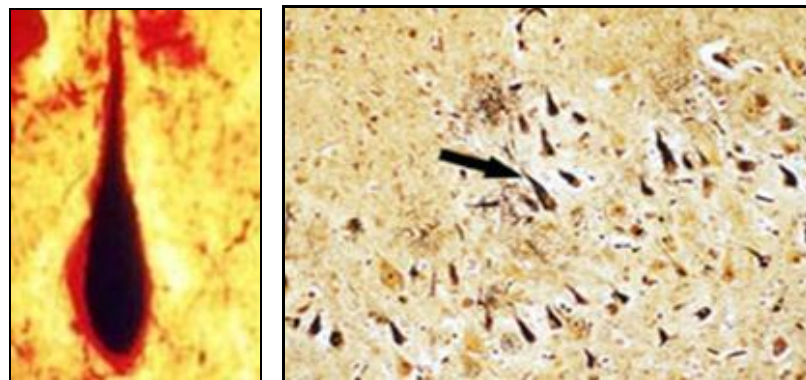


Figura 4 – Novelo neurofibrilar coloração pela prata (esquerda) e numerosos emaranhados neurofibrilares (direita). Disponível em <<http://www.alzheimermed.com.br/conceitos/neuropatologia>>. Acesso em 27/09/12.

Desde a primeira descrição feita em 1906 por Alois Alzheimer, as placas senis e os emaranhados neurofibrilares são considerados a chave patológica característica da DA. A identificação do peptídeo A β nas PS e os estudos genéticos que identificaram as mutações nos genes *APP*, *PSEN1* e *PSEN2*, que estão relacionadas com o acúmulo de A β e com DA familiar de início precoce, resultaram na “hipótese da cascata do amiloide” (HCA). De acordo com essa teoria, a deposição de A β é o gatilho patológico inicial da doença que, na sequência, levará à formação de NFTs, morte celular e demência (Figura 5). A hipótese presume que a deposição de A β pode explicar a patogênese de todos os tipos de DA (REITZ, 2012). Entretanto, o mecanismo da causa das lesões pelo A β nos neurônios ainda não está nitidamente definido (DE FELICE *et al.*, 2004).

Outros estudos sugerem a “hipótese colinérgica da doença de Alzheimer”. A degeneração de neurônios no núcleo basal de Meynert, origem das grandes projeções colinérgicas para o neocórtex, ocorre precocemente no curso da doença, e pode contribuir de forma significativa com o declínio cognitivo observado nos pacientes com DA (WINKLER *et al.*, 1998). Essa disfunção colinérgica pode não causar um prejuízo cognitivo de forma direta, mas indiretamente pode interferir com o processamento da atenção. Com isso, os inibidores de colinesterases foram propostos para o tratamento sintomático da doença (FRANCIS *et al.*, 1999).

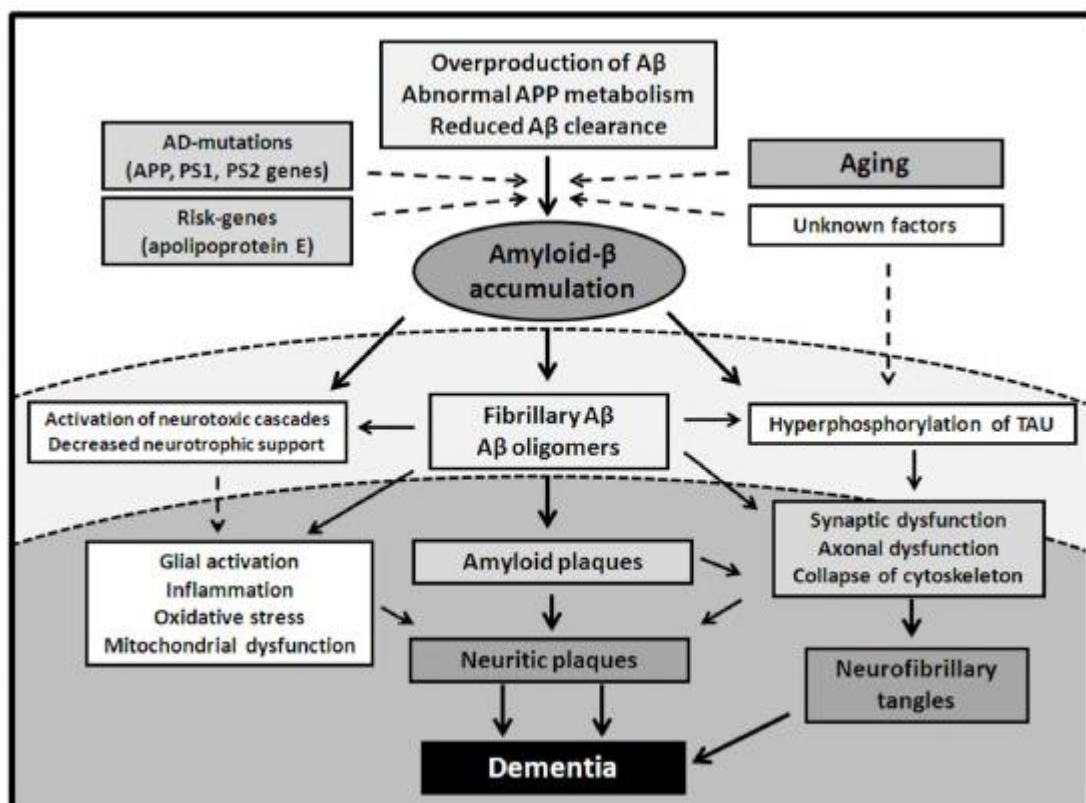


Figura 5 – Hipótese da Cascata do Amiloide no processo patológico da doença de Alzheimer (FORLENZA *et al.*, 2010).

O peptídeo β -amiloide, composto por 42 aminoácidos, é formado a partir da clivagem da proteína precursora do amiloide (APP), a qual parece estar envolvida na manutenção da plasticidade neuronal no cérebro adulto. A APP é uma proteína transmembrana codificada por um gene localizado no cromossomo 21 que sofre clivagem mediada por enzimas. A clivagem mais comum segue a via denominada não-amiloidogênica, com ação da enzima alfa-secretase e não ocorre deposição do

peptídeo beta-amiloide. Já na via denominada amiloidogênica, a APP é clivada pela beta-secretase, denominada BACE1, e também pela gama-secretase, liberando o peptídeo beta-amiloide (BRUCKI *et al.*, 2011).

A proteína *tau* na forma altamente fosforilada é o principal componente dos emaranhados neurofibrilares. Essa proteína contribui para manter a estabilidade dos microtúbulos associando-se a eles. A hiperfosforilação da *tau* por ação de quinases como a GSK-3 β , reduz sua afinidade para se ligar aos microtúbulos e altera a sua conformação espacial, levando a agregação molecular na forma de filamentos helicoidais pareados. A desestabilização dos microtúbulos e a formação desses filamentos fazem com que o transporte por esse sistema fique comprometido e o neurônio vai progressivamente perdendo suas conexões, culminando na morte celular (BRUCKI *et al.*, 2011).

Por fim, é possível observar que as lesões neuropatológicas clássicas, as placas senis e os emaranhados neurofibrilares, podem definir a DA, mas elas provavelmente representam a "ponta do iceberg" das alterações patológicas que causam o declínio cognitivo associado com a doença (SERRANO-POZO *et al.*, 2011). O desenvolvimento de novos marcadores biológicos e ferramentas de imagem tornou evidente que estes estigmas neuropatológicos da DA começam a acumular-se uma década ou mais antes da ocorrência dos primeiros sintomas clínicos de demência. Esses biomarcadores são variáveis (fisiológicas, bioquímicas, anatômicas) que podem ser medidos *in vivo* e que indicam características específicas de alterações patológicas relacionadas à doença. Os cinco biomarcadores mais estudados da patologia da DA são: diminuição do A β 42 e aumento da proteína *tau* no líquido, hipometabolismo de glucose (*fluorodeoxyglucose* - FDG-PET) e imagem da deposição do amiloide, ambos por PET (tomografia por emissão de pósitrons), e atrofia cerebral observada por ressonância magnética estrutural. Há evidências sugerindo que esses biomarcadores não atingem níveis anormais ou de pico simultaneamente, mas sim de uma forma ordenada, podendo dessa forma contribuir na avaliação do estadiamento da doença e diagnóstico ainda nas fases iniciais (Figura 6) (JACK *et al.*, 2010).

A perda de sinapses, as mudanças na plasticidade, a perda neuronal e a presença de formas microscópicas oligoméricas solúveis de A β e de proteína *tau*, provavelmente contribuem para uma degeneração progressiva do sistema neural, a

qual ocorre ao longo de décadas. A compreensão da história natural da doença é fundamental para o desenvolvimento de estratégias a fim de interromper a progressão da doença antes que o dano no sistema neuronal torne-se irreversível (SERRANO-POZO *et al.*, 2011).

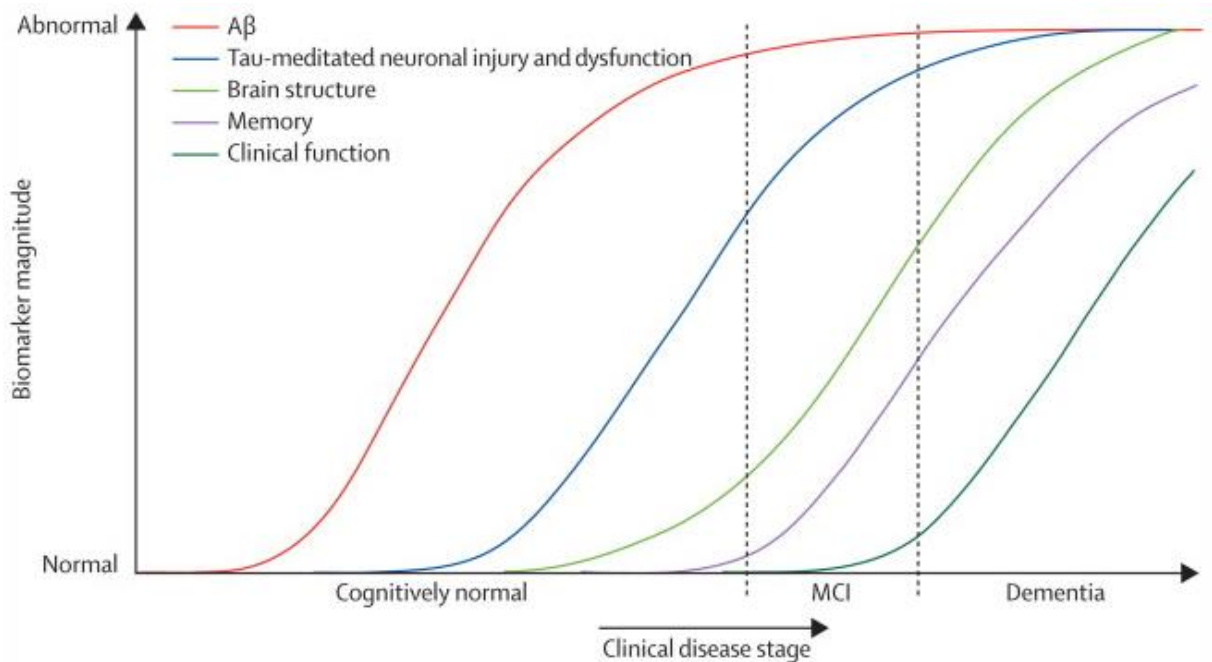


Figura 6 – Dinâmica dos biomarcadores na cascata patológica da doença de Alzheimer. Aβ é identificado pela presença de Aβ42 no líquido ou por imagem em PET. A lesão e disfunção neuronal mediada pela proteína *tau* é verificada no líquido ou por FDG-PET e a estrutura cerebral é mensurada a partir de ressonância magnética estrutural (JACK *et al.*, 2010).

4.3.3 Diagnóstico da Doença de Alzheimer

Em 1984, um grupo de trabalho formado pelo *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke* (NINCDS) e pela *Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (ADRDA) publicou os critérios diagnósticos para a DA. Tais critérios foram amplamente empregados com uma sensibilidade de 81% e especificidade de 70%. No entanto, 27 anos depois surgiu a necessidade de revisá-los. Dessa forma, o *National Institute on Aging* (NIA) e a *Alzheimer's Association* (AA) se uniram para formular critérios diagnósticos atualizados para a DA (McKHANN *et al.*, 2011). No Brasil, as recomendações para o diagnóstico da DA elaboradas pelos membros do Departamento de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia estão

baseadas nos critérios NIA-AA, mas apresentam algumas modificações e adaptações como descritas a seguir na íntegra (FROTA *et al.*, 2011):

1. Demência da doença de Alzheimer provável

Preenche os critérios para demência e tem adicionalmente as seguintes características:

- 1.1 Início insidioso (meses ou anos).
- 1.2 História clara ou observação de piora cognitiva.
- 1.3 Déficits cognitivos iniciais e mais proeminentes em uma das seguintes categorias:
 - Apresentação amnésica (deve haver outro domínio afetado).
 - Apresentação não-amnésica (deve haver outro domínio afetado).
 - Linguagem (lembranças de palavras)
 - Visual-espacial (cognição espacial, agnosia para objetos ou faces, simultaneoagnosia e alexia).
 - Funções executivas (alteração do raciocínio, julgamento e solução de problemas).
- 1.4 Tomografia ou, preferencialmente, ressonância magnética do crânio deve ser realizada para excluir outras possibilidades diagnósticas ou co-morbidades, principalmente a doença vascular cerebral.
- 1.5 O diagnóstico de demência da DA provável não deve ser aplicado quando houver:
 - Evidência de doença cerebrovascular importante definida por história de AVC temporalmente relacionada ao início ou piora do comprometimento cognitivo; ou presença de infartos múltiplos ou extensos; ou lesões acentuadas na substância branca evidenciadas por exames de neuroimagem; ou
 - Características centrais de demência com corpos de Lewy (alucinações visuais, parkinsonismo e flutuação cognitiva); ou
 - Características proeminentes da variante comportamental da demência frontotemporal (hiperoralidade, hipersexualidade, perseveração); ou
 - Características proeminentes de afasia progressiva primária manifestando-se como a variante semântica (também chamada demência semântica, com discurso fluente, anomia e dificuldades de memória semântica) ou como a variante não-fluente, com agramatismo importante; ou
 - Evidência de outra doença concomitante e ativa, neurológica ou não-neurológica, ou de uso de medicação que pode ter efeito substancial sobre a cognição.

Os seguintes itens, quando presentes, aumentam o grau de confiabilidade do diagnóstico clínico da demência da DA provável:

- a) Evidência de declínio cognitivo progressivo, constatado em avaliações sucessivas;
- b) Comprovação da presença de mutação genética causadora de DA (genes da APP e presenilinas 1 e 2);

- c) Positividade de biomarcadores que reflitam o processo patogênico da DA (marcadores moleculares através de PET ou líquido; ou neuroimagem estrutural e funcional).

A ocorrência do item a confirma a existência de um mecanismo degenerativo, apesar de não ser específico da DA.

2. *Demência da doença de Alzheimer possível*

O diagnóstico de demência da DA possível deve ser feito quando o paciente preenche os critérios diagnósticos clínicos para demência da DA, porém apresenta alguma das circunstâncias abaixo:

- 2.1 Curso atípico: início abrupto e/ou padrão evolutivo distinto daquele observado usualmente, isto é lentamente progressivo.
- 2.2 Apresentação mista: tem evidência de outras etiologias conforme detalhado no item 4 dos critérios de demência da DA provável (doença cerebrovascular concomitante; características de demência com corpos de Lewy; outra doença neurológica ou uma co-morbidade não-neurológica ou uso de medicação as quais possam ter efeito substancial sobre a cognição).
- 2.3 Detalhes de história insuficientes sobre instalação e evolução da doença.

3. *Demência da doença de Alzheimer definida*

Preenche critérios clínicos e cognitivos para demência da DA e exame neuropatológico demonstra a presença de patologia da DA segundo os critérios do NIA e do *Reagan Institute Working Group* (Hyman *et al.*, 1997).

4.3.4 Tratamento da doença de Alzheimer

Embora a “hipótese do amiloide” afirme que a etiologia da DA esteja vinculada ao acúmulo do A β , não há ainda uma droga disponível comercialmente que tenha o β -amiloide ou a proteína *tau* como alvos no tratamento da doença. Muitas pesquisas têm sido feitas com esse objetivo, mas os ensaios clínicos mostraram resultados decepcionantes. Como na DA ocorre também níveis reduzidos de acetilcolina e excesso de atividade do glutamato, os fármacos disponíveis para o tratamento da doença têm como alvo esses dois sistemas (CASEY *et al.*, 2010). Dessa forma, o tratamento farmacológico envolve principalmente a utilização de inibidores das colinesterases, nas fases leve a moderada, e antagonistas glutamatérgicos de receptores NMDA, para as fases moderada a grave da doença (ENGELHARDT *et al.*, 2005).

Os inibidores das colinesterases ou anticolinesterásicos são os agentes de primeira linha no tratamento da doença de Alzheimer. A tacrina foi a primeira droga dessa classe a ser aprovada, seguida pelo donepezil, rivastigmina e por último a galantamina (JANN *et al.*, 2002). No entanto, a tacrina caiu em desuso devido a

elevação de enzimas hepáticas em 49% dos pacientes (WATKINS *et al.*, 1994) com evidências de hepatotoxicidade e queixas gastrointestinais reversíveis com a descontinuação do tratamento (KNAPP *et al.*, 1994), sendo raramente prescrita. A classe de fármacos antagonistas de receptores NMDA possui a memantina como único representante disponível no mercado (CASEY *et al.*, 2010).

A tabela 1 mostra esses medicamentos aprovados para o tratamento de DA e seus respectivos modos de ação, apresentação, doses e posologia (BRUCKI *et al.*, 2011).

Tabela 1 – Fármacos aprovados para o tratamento da doença de Alzheimer no Brasil (BRUCKI *et al.*, 2011 adaptado de Engelhardt *et al.*, 2005).

Fármaco	Modo de ação	Apresentações	Dose inicial	Dose máxima	Posologia
Galantamina ER*	Anticolinesterásico	Comprimidos de 8 mg; 16 mg e 24 mg	8 mg/dia	24 mg/dia	Uma vez ao dia
Donezepil	Anticolinesterásico	Comprimidos de 5 e 10 mg	5 mg/dia	10 mg/dia	Uma vez ao dia
Rivastigmina**	Anticolinesterásico	Comprimidos de 1,5 mg; 3mg; 4,5 mg e 6 mg	3 mg/dia	12 mg/dia	Duas vezes ao dia (12/12 horas)
Memantina	Antagonista glutamatérgico NMDA	Comprimidos de 10 mg	5 mg/dia	20 mg/dia	Duas vezes ao dia (12/12 horas)

*A galantamina possui apresentações ER de 4 mg; 8 mg e 12 mg, com uso de 12/12 horas.

**A rivastigmina também é disponível em apresentações em soluções líquida com 2 mg/mL e em patch transdérmico de 18 mg/10cm² e 9 mg/5cm².

4.3.4.1 Inibidores das Colinesterases

A DA está associada a níveis reduzidos de vários neurotransmissores como acetilcolina (ACh), noradrenalina, serotonina e somatostatina, e a altos níveis de glutamato. No entanto, os déficits cognitivos parecem estar principalmente relacionados à degeneração dos neurônios colinérgicos. Por isso, o tratamento para DA envolve a restauração dos neurotransmissores colinérgicos através de diferentes abordagens como a exploração de precursores da ACh, uso de agonistas muscarínicos ou nicotínicos e, principalmente, a utilização de inibidores de colinesterase (IChEs). Os IChEs constituem a primeira classe de drogas anti-DA aprovada pelo FDA e atuam reduzindo a hidrólise da ACh na fenda sináptica por inibição da acetilcolinesterase (AChE) e/ou butirilcolinesterase (BChE) (SOZIO *et al.*, 2012). Esta inibição aumenta a quantidade de ACh disponível na fenda sináptica

para estimular receptores muscarínicos e nicotínicos, centrais e periféricos. A inibição central é necessária para potencializar os efeitos cognitivos da acetilcolina, enquanto que periféricamente, essa inibição está relacionada com o aparecimento dos efeitos colaterais (DARVESH *et al.*, 2003). A figura 7 apresenta a estrutura química dos inibidores das colinesterases.

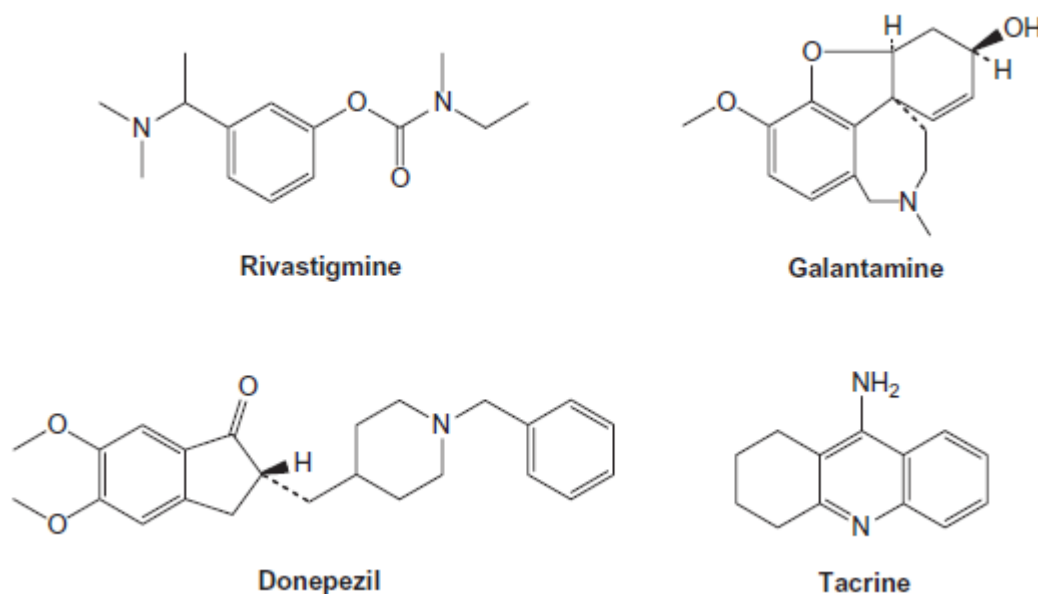


Figura 7 – Estrutura química dos inibidores de colinesterases (SOZIO *et al.*, 2012).

Os anticolinesterásicos são drogas rapidamente absorvidas pelo trato gastrointestinal, levando aproximadamente menos de 2 horas para atingir a concentração máxima, exceto o donepezil que tem absorção mais longa, em torno de 3 a 5 horas. Os anticolinesterásicos apresentam uma relação não linear entre a dose e a inibição da colinesterase, ocorrendo um efeito platô em diferentes doses de acordo com a droga utilizada. O benefício clínico ocorre com 40 a 70% de inibição da colinesterase. Em ensaios clínicos, os IChEs demonstram um efeito sobre a cognição e atividades funcionais dependentes da dose. A melhoria dos sintomas comportamentais, no entanto, não apresenta efeito dose-dependente (JANN *et al.*, 2002).

O donepezil e a galantamina são fármacos metabolizados no fígado pela enzima citocromo P450 2D6 (CYP2D6) e pela CYP3A4 respectivamente, exigindo maior atenção com as possíveis interações medicamentosas. A rivastigmina, por sua vez, não sofre metabolização significativa pelas enzimas CYP. É metabolizada

rápida e extensivamente por conjugação de sulfato no soro e no seu local de ação pelas colinesterases, sendo rapidamente eliminada pelos rins (JANN *et al.*, 2002).

A galantamina e o donepezil, são inibidores competitivos de curta duração que se ligam reversivelmente à AChE (JANN *et al.*, 2002). Por outro lado, a rivastigmina é considerada um inibidor intermediário ou “pseudo-irreversível” tanto da AChE quanto da BChE, pois não inibe diretamente a formação do complexo enzima-acetilcolina como galantamina e donepezil, mas diminui a atividade da enzima diretamente (MAYEUX; SANO, 1999).

O uso de anticolinesterásicos gera melhora das manifestações clínicas dos pacientes com DA, em especial na esfera cognitiva. No entanto, não impedem a progressão da doença (PARNETTI, 2007). Os IChEs não apresentam diferenças importantes quanto a eficácia (RAINA *et al.*, 2008), sendo que a escolha deve estar relacionada ao custo, tolerabilidade individual, experiência e preferência médica (TRINH *et al.*, 2003).

O donepezil é um inibidor derivado da piperidina, com meia-vida de aproximadamente 70 horas (BRUCKI *et al.*, 2011). O tratamento é iniciado com 5 mg/dia, aumentando a dose para 10 mg/dia de acordo com a tolerabilidade (ENGELHARDT *et al.*, 2005). Em 2010, o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou os comprimidos de liberação prolongada SR (*sustained-release*) contendo 23 mg de donepezil afim de proporcionar uma dose diária maior do fármaco e evitar picos de concentração. O donepezil SR 23 mg demonstrou benefícios cognitivos e globais significativos, mas estudos de segurança e eficácia a longo prazo ainda estão sendo realizados (SOZIO *et al.*, 2012). A eficácia do donepezil foi demonstrada em um estudo duplo-cego de 24 semanas em pacientes com DA leve a moderada, apresentando benefício no ADAS-Cog em relação ao placebo e em escores de impressão clínica. Entretanto, nesse mesmo trabalho, não foi verificado efeito em medidas relacionadas à qualidade de vida dos pacientes (BRUCKI *et al.*, 2011). Black *et al.* (2007), relataram melhora na SIB (*Severe Impairment Battery*), escores de impressão clínica e no minimal de pacientes com DA grave em relação ao placebo, porém não observaram melhora nas atividades diárias, no inventário neuropsiquiátrico e em escalas de estresse de cuidadores.

A rivastigmina é um derivado do carbamato (BRUCKI *et al.*, 2011). A inibição simultânea da BChE por essa droga pode eventualmente prolongar o benefício do

tratamento. A meia-vida é de 1-2 horas, porém apresenta atividade prolongada de 8-10 horas. O tratamento deve se iniciar com 1,5 mg 2 vezes/dia, com escalonamento da dose até 6 mg 2 vezes/dia (ENGELHARDT *et al.*, 2005). Em estudo com 1195 pacientes com DA de 21 países durante seis meses, o patch transdérmico de 10 cm² (9,5 mg por 24 horas) mostrou ter eficácia similar com menos efeitos gastrointestinais quando comparado com a rivastigmina via oral de 12 mg/dia e o patch de 20 cm² apresentou melhora cognitiva superior em 2 de 5 medidas do ADAS-Cog em relação ao patch de menor dose (WINBLAD *et al.*, 2007). Bartorelli *et al.* (2005) observou que pacientes com DA avançada em tratamento com inibidor seletivo para a AChE podem ser beneficiados com a alteração para a rivastigmina no que diz respeito a estabilização da doença e melhora da função cognitiva.

A galantamina é um alcaloide inibidor (POHANKA, 2011) que também atua como modulador dos receptores nicotínicos, potencializando ainda mais a neurotransmissão colinérgica (MICHAELIS, 2003). Alguns autores sugerem que a modulação nicotínica pode ter benefício no domínio cognitivo da atenção. Um estudo brasileiro mostrou que o tratamento com galantamina por três meses melhorou o desempenho em testes neuropsicológicos computadorizados de atenção e de memória episódica em pacientes portadores da DA leve a moderada (CARAMELLI *et al.*, 2004). Burns *et al.* (2009) também demonstraram que a galantamina pode ser utilizada com segurança e boa tolerabilidade em pacientes idosos com DA grave, apresentando melhora na função cognitiva, em particular à memória, práxis e habilidade visuo-espacial. No entanto, o estudo não encontrou efeito significativo sobre as atividades diárias gerais dos pacientes. Murray *et al.* (2004) relataram que os benefícios cognitivos da galantamina parecem ser mantidos por pelo menos 36 meses em pacientes com demência leve a moderada, sugerindo que esse fármaco pode reduzir a evolução clínica da DA. A dose inicial é de 4 mg 2 vezes/dia, escalonada para até 12 mg 2 vezes/dia (ENGELHARDT *et al.*, 2005). Com o lançamento da galantamina ER (*extended release*), a posologia uma vez ao dia também pode ser aplicada para esse fármaco (BRUCKI *et al.*, 2011).

Estudo de Raina *et al.* (2008) realizou uma revisão sistemática em bancos de dados de janeiro de 1986 a novembro de 2006, afim de avaliar o grau de benefício dos inibidores de colinesterase (donepezil, galantamina, rivastigmina e tacrina). Esse estudo mostrou que a melhora nas medidas cognitivas e avaliações globais foram

estatisticamente significantes e clinicamente marginais, sendo que poucas avaliações adequadas em relação ao comportamento e qualidade de vida dos pacientes foram observadas.

Os efeitos colaterais dos inibidores de colinesterase, em sua maioria são gastrointestinais como náuseas, diarreias e vômitos. Essas drogas também podem acentuar bradiarritmias em pacientes com doença do nó sinusal e em arritmias graves, aumentar secreção brônquica e potencializar agentes colinérgicos. Deve-se considerar a realização de eletrocardiograma (ECG) antes e após a introdução da medicação, sendo necessário considerar o risco/benefício do tratamento, caso sejam observadas arritmias. A titulação lenta da medicação diminui os efeitos colaterais, geralmente mais observados no início do tratamento (BRUCKI *et al.*, 2011). Isik *et al.* (2012) avaliaram os efeitos colaterais colinérgicos no sistema cardiovascular de pacientes com DA em tratamento com donepezil e não encontraram mudanças significativas nos parâmetros do ECG e na pressão arterial em qualquer uma das doses (5 e 10 mg/dia).

O uso concomitante de dois anticolinesterásicos não é indicado, porém a associação com a memantina é aceita e recomendada devido aos mecanismos complementares de ação (BRUCKI *et al.*, 2011). Revisão sistemática e meta-análise de ensaios clínicos randomizados de Farrimond *et al.* (2012) demonstraram que não há benefício da terapia combinada em relação à monoterapia com inibidor de colinesterase em pacientes com DA moderada a grave. Em contradição, Grossberg *et al.* (2006) relataram que a co-administração de galantamina com memantina não reduz a inibição da AChE, não altera o perfil farmacocinético da galantamina, apresenta boa tolerabilidade e potencial benefício no tratamento da DA, apoiando assim a viabilidade da terapia combinada dos dois agentes.

4.3.4.2 Antagonistas dos Receptores Glutamatérgicos

O glutamato é principal neurotransmissor excitatório em neurônios corticais e no hipocampo (ORGOGOZO *et al.*, 2002). Um dos receptores ativados pelo glutamato é o NMDA, envolvido em mecanismos de aprendizagem e memória. Foi proposto que, na DA, o β -amiloide leva a uma estimulação excessiva de receptores NMDA, gerando influxo de cálcio e disparando uma série de cascatas intracelulares que culminam em morte neuronal. Dessa forma, drogas antagonistas dos receptores

NMDA, as quais teriam um efeito neuroprotetor, foram propostas para tratamento da DA (BRUCKI *et al.*, 2011).

A memantina é um antagonista não competitivo de afinidade moderada dos receptores NMDA que bloqueia os efeitos dos níveis patologicamente elevados de glutamato que podem levar à disfunção neuronal. A droga possui pequeno efeito, porém consistente na terapia para DA, sendo indicada na fase avançada da doença (FARRIMOND *et al.*, 2012). Em outubro de 2003, o FDA aprovou a utilização de memantina em pacientes com DA em fase moderada a grave (BRUCKI *et al.*, 2011). Na Europa sua utilização na terapia tem gerado controvérsias. O NICE (*National Institute for Clinical Excellence*) recomenda a utilização de memantina em casos de doença grave ou como tratamento de segunda linha em caso de doença moderada para pacientes que são intolerantes ou que possuem contra indicação para o uso de inibidores de colinesterase. Para pacientes com DA leve, faltam evidências do benefício clínico da memantina e sua administração nesse caso ainda não foi aprovada (FARRIMOND *et al.*, 2012). Raina *et al.* (2008), em uma revisão sistemática, concluíram que a memantina mostra melhora significativa na cognição e avaliação global da demência, porém seus efeitos ainda são de significância clínica incerta.

A dose inicial de memantina é de 5 mg/dia, escalonada para 10 mg 2 vezes/dia. Possui pouca interação medicamentosa, já que sua eliminação é renal e não interfere com o sistema de metabolização do citocromo P450 (ENGELHARDT *et al.*, 2005).

4.3.4.3 Outras Estratégias Farmacoterapêuticas

Devido ao aumento progressivo no conhecimento sobre a fisiopatologia da doença de Alzheimer, o alvo da pesquisa terapêutica tem sido o desenvolvimento de estratégias que possuem como alvos principais a deposição do β -amiloide e formação da *tau* hiperfosforilada, com o objetivo de modificar a evolução da doença (BRUCKI *et al.*, 2011).

Visto a grande participação do β -amiloide na patogênese da DA, as proteases que geram esse peptídeo, a β - e a γ - secretases, são os principais alvos no desenvolvimento terapêutico (WOLFE *et al.*, 2002). Porém, a interferência com essas enzimas pode levar a efeitos colaterais, pois a γ -secretase, por exemplo,

também é responsável pela clivagem de receptores transmembrana da família Notch, essencial para as vias de diferenciação celular em vários sistemas orgânicos como trato gastrointestinal e células linfoides (BRUCKI *et al.*, 2011). No entanto, inibidores de γ -secretases também obtiveram bons resultados iniciais e passam por estudos de fase III em humanos, como é o caso do LY-450139. O inibidor demonstrou redução nos níveis de A β no plasma de pacientes com DA leve a moderada. Houve também redução do A β no hipocampo e córtex de camundongos (FLEISHER *et al.*, 2008). Outros estudos têm como objetivo aumentar a atividade da α -secretase afim de que a via não amiloidogênica da clivagem do A β seja predominante (BRUCKI *et al.*, 2011). Estudos pré-clínicos com Bryostatina 1 em ratos mostrou redução do β -amiloide, sem evidência de efeitos pró-tumorais (ETCHEBERRIGARAY *et al.*, 2004).

Alguns anti-inflamatórios não esteroidais mostraram-se como moduladores da atividade da γ -secretase em células de mamíferos e em ratos capazes de alterar a especificidade dessa protease (WOLFE, 2002). Inibidores da agregação de A β ou ainda o uso de quelantes através da ligação de A β com metais, particularmente cobre e zinco, e medicamentos que estimulam a degradação de A β também estão em estudo como potenciais modulares da γ -secretase (BRUCKI *et al.*, 2011). O zinco e o cobre podem formar complexos com o β -amiloide e o zinco, particularmente, pode induzir a agregação de A β em concentrações fisiológicas. Além disso, o Cu²⁺ e o Fe³⁺ são reduzidos na presença do β -amiloide, gerando espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, podendo causar danos neuronais. Dessa forma, estudos apresentaram agentes como o quelato de zinco que podem impedir a agregação do A β (WOLFE, 2002).

Outra estratégia para a prevenção do acúmulo do A β é potencializar o *clearance* desse peptídeo através da imunização ativa (com o β -amiloide) ou passiva (com anticorpos anti-A β) (WOLFE, 2002). Estudos pré-clínicos com modelos de DA em ratos transgênicos obtiveram resultados promissores, com *clearance* ou prevenção dos depósitos de beta-amiloide em protocolos de imunização ativa ou passiva (WOODHOUSE *et al.*, 2007). O sucesso em modelos animais com redução dos depósitos de β -amiloide e melhora em testes de memória levou ao uso da imunização em humanos. No entanto, algumas tentativas terapêuticas não obtiveram sucesso, como é o caso da vacina com peptídeo A β , cujo intuito era

promover a eliminação dos depósitos dessa proteína mediante sensibilização do sistema imunológico com consequente fagocitose por macrófagos. O ensaio foi interrompido devido aos casos de encefalite muito provavelmente desencadeada por mecanismos autoimunes (BRUCKI *et al.*, 2011). Nota-se que o tipo e a extensão da resposta inflamatória à imunoterapia têm resultados positivos, *clearance* das placas neuríticas, e também consequências negativas, como angiopatia e encefalite. Por isso, o foco atual principal para a imunoterapia na DA é a compreensão dos mecanismos imunomediados pela imunização que age no β -amiloide cerebral (WOODHOUSE *et al.*, 2007).

Alguns trabalhos têm como foco os moduladores da fosforilação da *tau* através da inibição de quinases, como a quinase glicogênio sintase (GSK) (DUFF, 2006). Estudos mostraram que os inibidores de GSK-3 reduzem a produção de A β e a fosforilação da *tau*, podendo reduzir a neurotoxicidade provocada por esses agentes na DA (JOPE *et al.*, 2007). O lítio foi investigado como possível inibidor da GSK-3 e apresentou evidências de que sua utilização pode ser terapeuticamente efetiva para redução da patologia provocada pela *tau* (NOBLE *et al.*, 2005). A imunoterapia anti-*tau* também é alvo de estudos. A substância Rember (MTC, remberTM) bloqueia a formação da proteína *tau* através da transformação dos oligômeros que constituem os filamentos da proteína hiperfosforilada em monômeros, os quais são eliminados por proteases, diminuindo assim a ação patológica da *tau* na DA (WISCHIK *et al.*, 2008).

4.3.5 A genética na Doença de Alzheimer

De acordo com o padrão genético, a doença de Alzheimer é dividida em duas formas: (1) familiar, com herança Mendeliana e predominantemente de início precoce (antes dos 60 anos de idade) conhecida como *early-onset familial AD* (EOFAD); (2) esporádica, com menor ou nenhuma agregação familiar, ocorrendo geralmente mais tardiamente (após os 60 anos de idade) a *late-onset AD* (LOAD). No entanto, trata-se de uma divisão bastante simplificada, pois há descrição de casos de EOFAD sem evidência de padrão Mendeliano de herança assim como de LOAD com forte agregação familiar (BERTRAM *et al.*, 2010). A doença de Alzheimer de início tardio e a DA de início precoce são indistinguíveis clinicamente. No entanto,

a forma precoce é geralmente mais grave e está associada com progressão mais rápida da doença (REITZ *et al.*, 2011).

Os genes da proteína precursora do amiloide (*APP*), presenilina-1 (*PSEN1*) e presenilina-2 (*PSEN2*), os quais codificam proteínas envolvidas na geração de β -amiloide, foram implicados na patologia da doença de início precoce (Figura 8). Mutações nesses genes exibem penetrância acima de 85% e apresentam padrão de herança autossômico dominante (REITZ *et al.*, 2011). No entanto, apenas 13% dos casos de EOFAD podem ser explicados por mutações em algum desses três genes (CAMPION *et al.*, 1999).

Embora a DA de início precoce possa ser explicada por mutações altamente penetrantes nos genes da *PSEN1*, *PSEN2* e *APP*, bem como nos casos de Síndrome de Down, a maioria dos casos de DA (90-95%) são de início tardio e vários fatores foram implicados no seu aparecimento, entre eles o alelo $\epsilon 4$ do gene *APOE*. Entretanto, ao contrário das mutações no precursor amiloide ou daquelas nas presenilinas, o alelo *APOE* $\epsilon 4$, aumenta o risco para a doença de Alzheimer, porém, mesmo em homozigose, não garante a ocorrência da doença (LAWS *et al.*, 2003). Os genes envolvidos com o risco para a DA de início tardio não são herdados de forma mendeliana. Os parentes de primeiro grau dos pacientes com esse tipo de DA têm o dobro do risco para apresentar a doença em relação aos que não possuem parentes de primeiro grau afetados (REITZ *et al.*, 2011). Trata-se de uma doença complexa em que a susceptibilidade para desenvolvê-la é conferida por inúmeros fatores de risco, entre eles o genético. Os fatores genéticos de risco são de frequência relativamente alta nesse caso, porém com baixa penetrância (BERTRAM *et al.*, 2010). Entretanto, mesmo que a DA de início tardio seja denominada como “esporádica”, vale ressaltar que, 60-80% dessa forma da doença é determinada geneticamente (GATZ *et al.*, 2006).

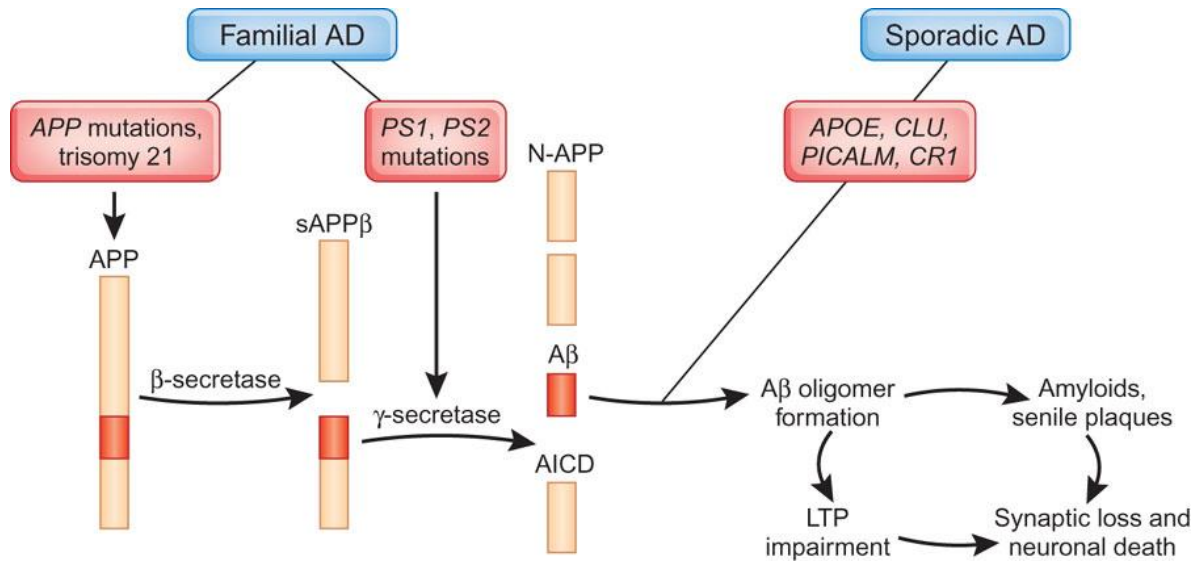


Figura 8 – O equilíbrio entre o processamento e a eliminação da APP na doença de Alzheimer. A APP é clivada pela β -secretase e posteriormente pela γ -secretase, formando o Aβ. Na DA familiar, mutações nos genes *APP*, *PSEN1* e *PSEN2*, ou uma cópia extra do *APP* na síndrome de Down foram propostos no processamento aumentado da APP. Já na DA esporádica, variantes genéticas nos genes *APOE*, *PICALM*, *CLU* e *CR1* podem estar envolvidas na redução da eliminação do Aβ (VAN ES; VAN DEN BERG, 2009).

Antes da era dos *genome-wide association studies*, os GWAS, houve pouco progresso na identificação da causa genética para a LOAD. O alelo *APOE* $\epsilon 4$ do gene *APOE* foi o único fator de risco bem estabelecido tanto para a forma de início precoce quanto para a forma de início tardio da DA. Indivíduos com um alelo $\epsilon 4$ têm um risco cerca de três vezes maior de desenvolver a DA, enquanto que a presença de dois alelos $\epsilon 4$ confere um risco em torno de 15 vezes maior em comparação com os indivíduos com o genótipo mais comum, *APOE* $\epsilon 3\epsilon 3$ (BETTENS *et al.*, 2013).

Revisão feita por Bettens *et al.* (2013) constatou que, pelo menos nove novos loci foram encontrados tendo relação com a doença de Alzheimer esporádica através de um GWAS europeu e colaboradores: *CLU*, *CR1*, *PICALM*, *BIN1*, *MS4A*, *CD2AP*, *CD33*, *EPHA1* e *ABCA7*. Embora não se saiba exatamente o mecanismo envolvido, cada um desses genes estaria envolvido em diferentes vias como processamento de lipídios (*CLU* e *ABCA7*), sistema complemento, inflamação e sistema imune (*CLU*, *CR1*, *ABCA7*, *CD33* e *EPHA1*) e mecanismos de função sináptica (*PICALM*, *BIN1*, *CD33* e *CD2AP*). Por outro lado, para a doença de Alzheimer de início precoce, foram descobertos mutações nos genes *NOTCH3* e *SORL1* através do sequenciamento completo do exoma de indivíduos com essa

forma de DA. Além disso, uma meta-análise recente feita pelo *International Genomics of Alzheimer's Project* (IGAP) (Figura 9) relatou onze novos loci de susceptibilidade para DA (*CASS4*, *CELF1*, *FERMT2*, *HLA-DRB5/HLA-DRB1*, *INPP5D*, *MEF2C*, *NME8*, *PTK2B*, *SLC24A4/RIN3*, *SORL1* e *ZCWPW1*) além de confirmar oito já descritos (*CR1*, *BIN1*, *CD2AP*, *EPHA1*, *CLU*, *MS4A6A*, *PICALM* e *ABCA7*) (MEDWAY; MORGAN, 2014).

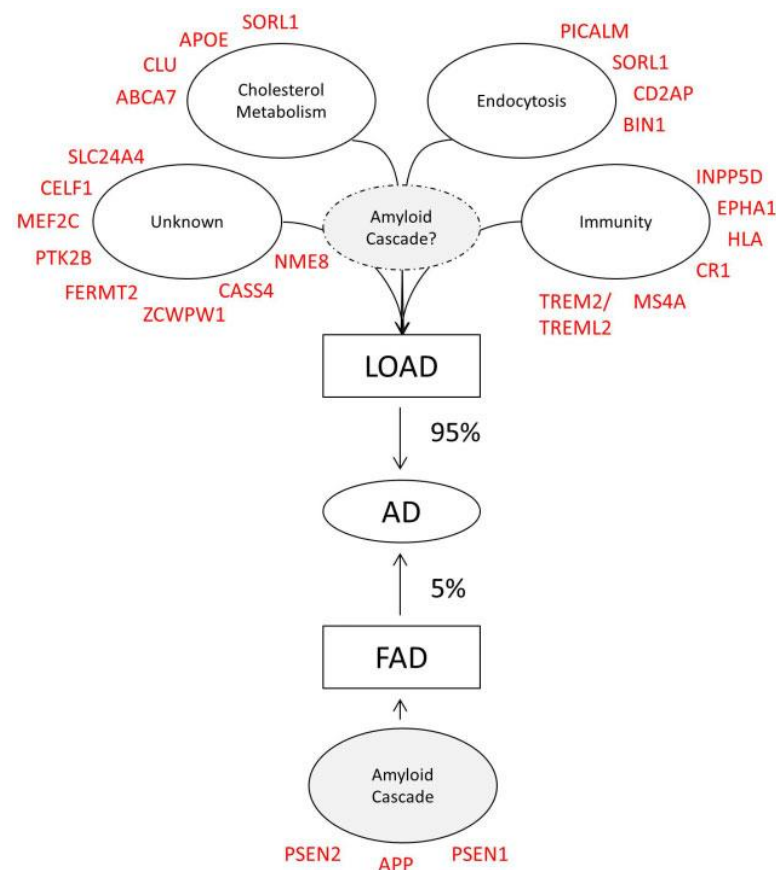


Figura 9 – Vias implicadas na doença de Alzheimer. A doença de Alzheimer de familiar (FAD) é explicada pelos três genes envolvidos no processamento do amiloide. Na doença de Alzheimer de início tardio (LOAD) há vários genes candidatos de diferentes vias metabólicas (colesterol, sistema imunológico, endocitose e outras ainda desconhecidas) (MEDWAY; MORGAN, 2014).

Cruchaga *et al.* (2014), através da sequenciamento completo do exoma de 14 famílias grandes com histórico de LOAD juntamente com análises de dados obtidos em diversos grandes estudos caso-controle, encontraram uma variante rara no gene *PLD3* (fosfolipase D3, Val232Met) envolvida com o aparecimento da doença de início tardio e também no processamento da APP. O estudo indica que portadores de variantes codificantes desse gene apresentam um risco duas vezes maior de

desenvolver a forma esporádica da DA. Guerreiro *et al.* (2013) descreveram algumas variantes do gene *TREM2* relacionadas com o risco para a DA esporádica, e concluíram que variantes raras desse gene estão associadas com um risco aumentado para o desenvolvimento da doença.

Além de fatores genéticos de risco, já foram descritos também fatores de proteção para a DA. Estudo de Jonsson *et al.* (2012) encontrou uma mutação na região codificante do gene *APP* (A673T) que protege contra a DA e o declínio cognitivo em idosos sem a doença. De acordo com os autores, essa substituição resulta em diminuição de aproximadamente 40% na formação do peptídeo amiloide *in vitro*, reforçando assim a hipótese de que a redução na clivagem da APP pela β -secretase pode proteger contra a DA.

Diante de tantos estudos em busca da causa genética para a doença de Alzheimer de início tardio, torna-se evidente que o seu aparecimento depende da interação entre diversos genes, fatores ambientais e também a idade. Uma avaliação mais aprofundada a respeito da interação entre determinados genes e seus respectivos efeitos sobre a homeostase neuronal pode fornecer informações importantes sobre a neurobiologia complexa da doença (IZZO *et al.*, 2013).

4.3.5.1 O gene *APOE*

O gene *APOE*, que determina a produção de apolipoproteína E (apoE), está localizado no braço longo do cromossomo 19 (19q13.2), possui aproximadamente 3,7 Kb de comprimento e contém quatro exons e três íntrons (Figura 10) (DAS *et al.*, 1985; PAIK *et al.*, 1985). Pericak-Vance *et al.* (1991), verificaram a associação do gene com a DA de início tardio, esporádica e familiar. Posteriormente, outros autores também encontraram associação do alelo $\epsilon 4$ do gene *APOE* com a DA esporádica (POIRIER *et al.*, 1993) e com a DA familiar de início tardio (STRITTMATTER *et al.*, 1993).

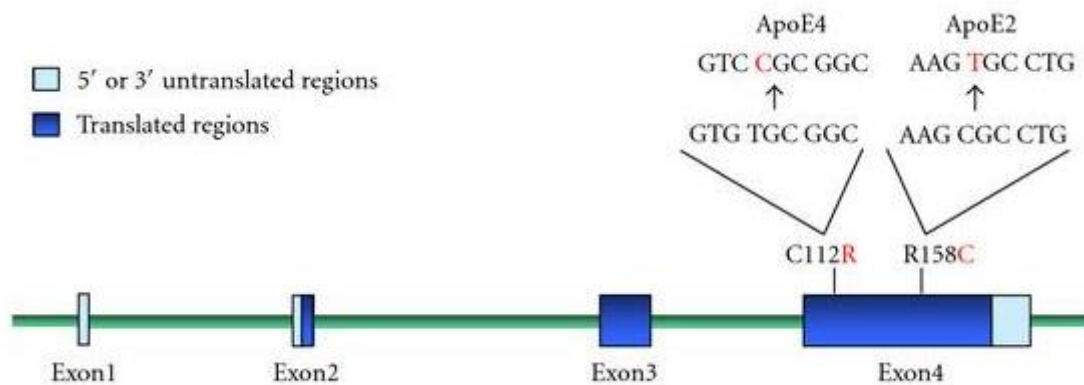


Figura 10 – Estrutura do gene APOE humano. O gene contém 4 exons, sendo que o exon 4 contém dois SNPs envolvidos na determinação da proteína ApoE4 (Cys112Arg) e da ApoE2 (Arg158Cys). A sequência do tipo selvagem determina a proteína ApoE3 (Cys112, Arg158) (adaptado de SCHELLENBERG; MONTINE, 2012).

Existem três alelos comuns do gene *APOE* designados $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ (WEISGRABER *et al.*, 1981) sendo o *APOE3* ($\epsilon 3$) o alelo mais comum, representando aproximadamente 78% de todos os cromossomos, seguido pelo alelo *APOE4* ($\epsilon 4$), 15%, e *APOE2* ($\epsilon 2$), 7%. A proporção desses alelos varia entre os grupos étnicos, particularmente no que diz respeito a proporção relativa entre *APOE2* e *APOE4* (STRITTMATTER; ROSES, 1995). Há outras variantes do *APOE* denominadas $\epsilon 1$, $\epsilon 5$ e $\epsilon 7$, mas são extremamente raras (LAWS *et al.*, 2003).

Diversos estudos correlacionaram a densidade da placa amiloide com o genótipo do *APOE*, sendo que placas de maior densidade foram encontradas com maior frequência em indivíduos homozigotos *APOE* $\epsilon 4$ do que homozigotos *APOE* $\epsilon 3$ ou heterozigotos *APOE* $\epsilon 3/\epsilon 4$ (LAWS *et al.*, 2003). O alelo *APOE* $\epsilon 2$ foi associado ao atraso no início da DA e redução no risco para a doença, sugerindo um efeito protetor desse alelo (ROSES, 1996; LAWS *et al.*, 2003).

Aproximadamente 40-65% dos pacientes com doença de Alzheimer possuem pelo menos uma cópia do alelo *APOE* $\epsilon 4$ (HUANG, 2006). Indivíduos com dois alelos $\epsilon 4$ possuem maior risco para DA e início precoce da doença em relação aos que herdaram somente um alelo ou nenhum (ROSES, 1996).

No Brasil, estudo feito por Almeida e Shimokomaki (1997) no estado de São Paulo, também encontrou associação entre o alelo *APOE* $\epsilon 4$ e a doença de Alzheimer, porém ressalta que a presença do alelo não é necessária ou suficiente para o desenvolvimento da doença. Outro estudo brasileiro de Cação *et al.* (2007)

encontrou associação entre o alelo $\epsilon 4$ e a DA esporádica e familiar. O alelo $\epsilon 4$ também foi associado com o início precoce dos sintomas e, em contrapartida, o alelo $\epsilon 2$ foi sugerido como tendo efeito protetor para a DA familiar.

Outras patologias também já foram associadas com o gene *APOE*, há evidências de que a presença do alelo *APOE* $\epsilon 4$ está associada com o início significativamente precoce da doença de Parkinson e com o maior risco de demência (PANKRATZ *et al.*, 2006) e também com o curso mais grave da esclerose múltipla (FAZEKAS *et al.*, 2001).

Estudo de Lai *et al.* (2006), sugere que o alelo *APOE* $\epsilon 4$ interfere na função colinérgica pré-sináptica, pois está relacionado à redução na atividade de colina acetiltransferase no neocórtex, podendo assim contribuir para a neuropatologia da DA. Além disso, em pacientes com dois alelos $\epsilon 4$ há mais placas senis contendo β -amiloide no córtex temporal em relação aos pacientes com apenas um alelo.

4.3.5.2 A apolipoproteína E

A apoE é uma das diferentes proteínas da classe das apolipoproteínas, entre elas a apoD, apoC, apoJ, as quais realizam o transporte de lipídios no plasma e em outros fluidos corporais. Toda apoE periférica é sintetizada essencialmente no fígado. Trata-se de uma das mais importantes proteínas no transporte do colesterol e também a principal lipoproteína no sistema nervoso central, onde é sintetizada pelos astrócitos (LAWS *et al.*, 2003). Essa proteína ocorre em três isoformas denominadas apoE2, apoE3 e apoE4, as quais diferem em apenas dois resíduos de aminoácido nas posições 112 e 158 (WEISGRABER *et al.*, 1981). A proteína apoE4 possui resíduos de arginina nas posições 112 e 158 (Arg112, Arg158), a apoE3 possui uma cisteína na posição 112 (Cys112, Arg158) e a apoE2 possui resíduos de cisteína nas posições 112 e 158 (Cys112, Arg158) (ROSES, 1996). A síntese de apoE é aumentada em casos de injúria e está implicada no crescimento e reparação do sistema nervoso durante ou após a ocorrência de lesão, tendo também níveis elevados em diversas doenças neurodegenerativas crônicas (STRITTMATTER *et al.*, 1993). Metabolicamente e fisiologicamente, a forma mais comum, a apoE3, é considerada “normal”. A apoE2 possui afinidade reduzida pelo receptor LDL e está associada com a hiperlipoproteinemia tipo III. Já a apoE4, está relacionada com níveis elevados de colesterol plasmático e de LDL colesterol, predisposição para

doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer. Ao contrário da apoE2 e da apoE3, a apoE4 associa-se preferencialmente com lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) (RAFFAÏ *et al.*, 2001).

A apoE possui dois domínios estruturais, o domínio amino-terminal, o qual contém o sítio de ligação para o receptor LDL; e o domínio carboxi-terminal contendo a maior região de ligação de lipoproteína. Estudos mostraram que, na apoE4, o resíduo Arg-61 no domínio amino-terminal está exposto, permitindo interação com o resíduo Glu-255 no domínio carboxi-terminal e tornando a estrutura mais compacta. Na apoE2 e na apoE3, tal interação não ocorre, pois Arg-61 não está exposto (Figura 11) (RAFFAÏ *et al.*, 2001). A apoE4 possui preferencialmente a forma de “glóbulo fundido” (*molten globule state*), caracterizada por uma estrutura secundária globular e estrutura terciária sem rigidez em que a densidade diminui a partir do centro para a periferia, reduzindo assim sua estabilidade *in vitro* quando comparada com a apoE2 e apoE3 (RIDDELL *et al.*, 2008).

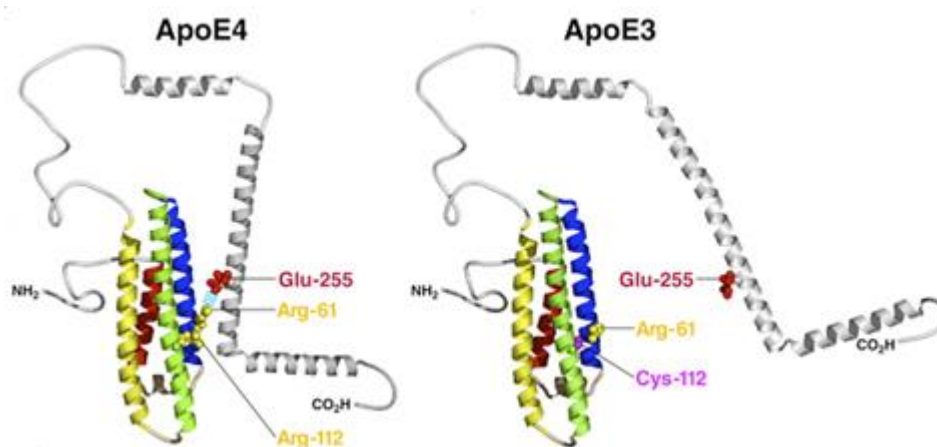


Figura 11 – Diferenças estruturais entre a apoE4 e a apoE3. Na apoE4, é possível a interação do resíduo Arg-61 com Glu-255, tornando a estrutura mais compacta. Disponível em: <<http://labs.gladstone.ucsf.edu/huang/pages/apoe-research>>. Acesso em 31/03/2014.

Os mecanismos pelos quais a apoE4 afeta o metabolismo das lipoproteínas e a neurodegeneração ainda permanecem desconhecidos. No entanto, a ocorrência dessa interação na estrutura da apoE4 humana foi sugerida como um fator importante dos efeitos adversos dessa isoforma (RAFFAÏ *et al.*, 2001). Além disso, Huang *et al.* (2001) encontram resultados compatíveis com a hipótese de que a proteína apoE4 sofre processamento preferencialmente intracelular, formando um

fragmento que interage com componentes do citoesqueleto produzindo inclusões nos neurônios semelhantes aos emaranhados neurofibrilares que contêm *tau* e neurofilamentos fosforilados de alto peso molecular. Essas inclusões podem contribuir para a susceptibilidade dos portadores do alelo $\epsilon 4$ à DA.

Lesões no córtex entorrinal, região afetada pela DA, induzem ao rápido aumento na expressão de mRNA da apolipoproteína E, reforçando a hipótese de que a apoE possui papel na reparação do neurônio danificado remodelando a membrana celular (POIRIER *et al.*, 1991). Dessa forma, em resposta aos danos produzidos por agentes estressores, os neurônios podem sintetizar apoE. Porém, apoE2 e apoE3 conferem proteção na reparação neuronal, já a apoE4, devido a sua instabilidade, estaria prejudicada nessa função, resultando em alterações neurodegenerativas. Além disso, essa isoforma ainda pode sofrer proteólise neurônio-específica, resultando em fragmentos tóxicos capazes de alterar o citoesqueleto e perturbar o balanço energético mitocondrial, provocando morte celular (ZHONG *et al.*, 2010).

A apoE é encontrada nas placas senis e nos emaranhados neurofibrilares da doença de Alzheimer e está envolvida na resposta regenerativa do nervo lesado (STRITTMATTER *et al.*, 1993). A apoE4 parece possuir maior afinidade pelo peptídeo A β e maior efeito na formação das fibrilas amiloides do que as demais isoformas (WISNIEWSKI; FRANGIONE, 1992). A apoE3 é menos reativa e não resulta nesses complexos. Além disso, apoE3 tem maior capacidade em proteger as células contra o dano oxidativo produzido pelos peptídeos β -amiloides do que a apoE4 (MAHLEY; RALL, 2000). Yamada *et al.* (1995) também obtiveram resultados que revelaram aumento na expressão de apoE no cérebro de indivíduos com DA, especialmente em pacientes com sobrevida longa, sugerindo que a apoE pode proteger contra a progressão de DA e que a apoE4, por outro lado, apresenta baixa proteção contra a patogênese da doença. Outro estudo sugeriu também que a quantidade reduzida de apoE total em portadores do alelo $\epsilon 4$ pode diretamente contribuir para a progressão da doença. Esse mesmo trabalho verificou que há degradação preferencial de apoE4 em relação à apoE3 nos astrócitos, ocasionando prejuízo no transporte do colesterol e afetando assim o reparo e manutenção dos neurônios (RIDDELL *et al.*, 2008). Com base nisso, Zhong *et al.* (2009) sugeriram a

conversão da apoE4 em apoE3 através de alterações no domínio de ligação com a Arg-61 como potencial alvo terapêutico.

4.4 COLINESTERASES

As colinesterases são enzimas que catalisam a hidrólise da acetilcolina (ACh) em colina e acetato, um processo essencial na neurotransmissão colinérgica (Figura 12). Há dois tipos de colinesterases: a acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) e a butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8), também conhecida como colinesterase plasmática ou pseudocolinesterase. O nome AChE é devido ao seu substrato natural, a acetilcolina, ao contrário da BChE, que não possui um substrato natural, mas possui a butirilcolina como seu substrato preferencial. Embora a atividade da BChE seja prevalente no corpo humano, sua função fisiológica não está completamente estabelecida (POHANKA, 2011). A butirilcolinesterase apresenta sequência de aminoácidos 53% semelhante à da AChE, incluindo a sequência de aminoácidos do sítio ativo de ambas as enzimas, o qual é conservado. Além disso, um sítio ativo no resíduo de serina, uma histidina e um resíduo de glutamato são considerados importantes para a atividade catalítica tanto da AChE quanto da BChE (BALASUBRAMANIAN; BHANUMATHY, 1993).

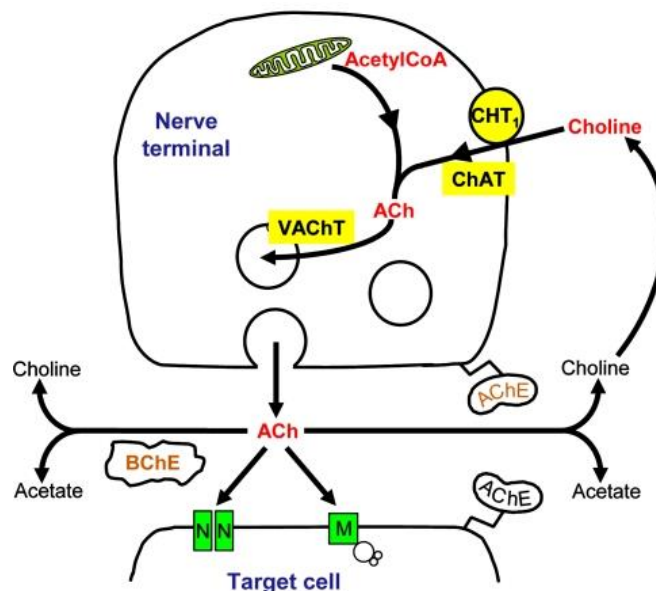


Figura 12 – Vias de síntese, liberação e hidrólise da acetilcolina em uma terminação nervosa colinérgica. AChE = acetilcolinesterase; BChE = butirilcolinesterase; ChAT = colina acetiltransferase; CHT₁ = transportador 1 de alta afinidade de colina; M = receptor muscarínico acoplado à proteína G; N = receptor nicotínico; VACHT = transportador vesicular de acetilcolina (KUMMER *et al.*, 2008)

A acetilcolinesterase, também chamada de colinesterase verdadeira ou específica é responsável pela hidrólise da acetilcolina nas sinapses colinérgicas, além de outras funções não colinérgicas (BALASUBRAMANIAN; BHANUMATHY, 1993). A AChE ocorre em diferentes formas moleculares e em diferentes tecidos como membrana do eritrócito, placa motora de músculos esqueléticos e em áreas do cérebro onde não há evidência de função colinérgica (JOHNSON; MOORE, 2000).

A BChE e a AChE podem ser diferenciadas pela sensibilidade à inibição de compostos como os organofosforados, já que a BChE é mais sensível a esse inseticida do que a AChE (STURM, 2000). Outra disparidade entre as duas enzimas é que a AChE é inibida por altas concentrações do substrato acetilcolina, enquanto que a BChE tem sua atividade aumentada nessas condições (GREIG *et al.*, 2005). Em pacientes com DA, há redução em até 85% nos níveis de AChE em regiões específicas do cérebro, enquanto que os níveis de BChE aumentam com a progressão da doença, especialmente da forma G₁ dessa enzima (ARENDET *et al.*, 1992).

A análise filogenética de expressão de AChE e BChE indica que as duas enzimas surgiram a partir de um precursor comum cuja função era a hidrólise de acetilcolina. Em *Drosophila*, por exemplo, um único gene codifica uma enzima que hidrolisa a acetilcolina e apresenta extensa homologia com a AChE de *Torpedo californica* (HALL; SPIERER, 1986) e atividade intermediária entre AChE e BChE (TOUTANT, 1989). Além disso, algumas colinesterases de invertebrados também mostram baixa especificidade de substrato (PRITCHARD *et al.*, 1994). Dessa forma, fica evidente que os genes *ACHE* e *BCHE* surgiram por duplicação gênica após o surgimento do sistema colinérgico.

As colinesterases AChE e BChE exercem atividades catalíticas adicionais. Essas enzimas apresentam atividade de aril-acilamidase amino-sensível (AAA), atividade semelhante à amidase e sem função fisiológica definida (GEORGE; BALASUBRAMANIAN, 1981; JAYANTHI *et al.*, 1992; JAGANATHAN; BOOPATHY, 2000). A aril-acilamidase amino-sensível é capaz de romper a ligação acil-amida que é semelhante àquela ligação encontrada em drogas analgésicas como o paracetamol e fenacetina. Se alguma dessas drogas for desacilada por AAA, é possível que a serotonina, inibidora de AAA, possa contribuir para prolongar a vida de tais drogas e melhorar seus efeitos. Ainda não foi possível demonstrar a quebra

desses fármacos por AAA, porém, pode-se considerar a existência de componentes analgésicos endógenos que sejam sensíveis à hidrólise por AAA e sua modulação por acetilcolina e serotonina, sugerindo um papel para as colinesterases no mecanismo da dor (BALASUBRAMANIAN; BHANUMATHY, 1993).

Diversos estudos sugerem a relação entre colinesterases, tumorigênese e proliferação celular (LAYER; SPORNS, 1987; LAPIDOT-LIFSON *et al.*, 1989; PATINKIN *et al.*, 1990; ZAKUT *et al.*, 1990; SOREQ *et al.*, 1991). Anteriormente à sinaptogênese, a BChE é distribuída no tubo neural das galinhas nas camadas ventriculares, enquanto que a AChE é localizada nas células da camada externa. O surgimento dessas duas colinesterases está correlacionado com as fases finais da proliferação celular em tecidos do cérebro e da retina do embrião de galinha. A expressão das colinesterases em períodos críticos do início da neurogênese sugere envolvimento no processo neurogenético (LAYER, 1990; ROBITZKI *et al.*, 1998).

Anormalidades na expressão dos genes *ACHE* e *BCHE* foram associadas a megacariocitopose, leucemias e tumores no cérebro, no ovário e nas mamas. O bloqueio desses genes interfere na hematopoiese em cultivos celulares, sugerindo uma influência colinérgica na proliferação celular (LAPIDOT-LIFSON *et al.*, 1989; PATINKIN *et al.*, 1990; ZAKUT *et al.*, 1990; SOREQ *et al.*, 1991; GARCIA-AYLLON *et al.*, 2001; RUIZ-ESPEJO *et al.*, 2002, 2003).

4.4.1 A Butirilcolinesterase

A butirilcolinesterase é sintetizada no fígado, sendo encontrada também no plasma, músculo liso, pâncreas, adipócitos, pele, cérebro e coração (WESCOE *et al.*, 1947). A proteína é expressa em neurônios e seus dendritos proximais na amígdala, hipocampo e tálamo (DARVESH; HOPKINS, 2003). Sua síntese nos adipócitos foi sugerida em ratos (ORES KOVIC; KUNEC-VAJIC, 1992) e em humanos (POPOVIC *et al.*, 1998).

A BChE hidrolisa de forma mais eficiente a butirilcolina, porém é capaz de hidrolisar desde a acetilcolina até a heptanoilcolina. Estudo de De Vriese *et al.* (2004) verificou que a BChE é capaz de degradar a grelina, estando relacionada com a sua desoctanoilação em soros humanos. Há estudos que relacionam a BChE à proteção da acetilcolinesterase (WHITTAKER, 1980; WHITTAKER, 1986) e ao metabolismo de lipídeos (KUTTY, 1980). Um estudo de LAYER *et al.* (1992)

encontrou correlação da BChE com o crescimento celular, diferenciação e mobilidade dos axônios e também na regulação da expressão da AChE. Este mesmo trabalho observou uma relação entre a expressão da BChE e altas taxas proliferativas em neuroblastos do tubo neural, células de retina e outros tipos celulares. No cérebro humano, a BChE é expressa em diversas áreas com funções cognitivas (DARVESH; HOPKINS, 2003), indicando um papel importante dessa enzima na cognição (MANOHARAN *et al*, 2007).

Estudo de Manoharan *et al.* (2007) revelou que o corpo humano contém dez vezes mais moléculas de BChE do que AChE. O trabalho também verificou o efeito da ausência completa de BChE em humanos, apontando apenas pequenas anormalidades nos testes clínicos como leve obstrução pulmonar e níveis elevados de creatina quinase-MB no coração. Os indivíduos completamente deficientes para essa enzima respondem de maneira anormal às doses padrão de succinilcolina e mivacúrio e, apesar da BChE ser capaz de inativar a grelina, o peso corporal normal desses indivíduos sugere a existência de rotas alternativas para essa inativação.

Experimentos realizados por MESULAM *et al.* (2002), sugerem que a AChE não é necessária para o estabelecimento das vias colinérgicas e que a BChE pode substituir essa enzima ao exercer a função de hidrólise de acetilcolina no cérebro normal. O experimento analisou camundongos normais e nulizigotos para acetilcolinesterase e verificou que todos os componentes anatômicos principais das vias colinérgicas centrais se desenvolveram normalmente. Foi observado atividade da BChE em todas as áreas do cérebro que recebem inervação colinérgica, tanto nos camundongos nulizogotos quanto nos normais. De acordo com Li *et al.* (2000), a BChE atua como um substituto da AChE mantendo e regulando a transmissão colinérgica quando a AChE está ausente ou com atividade comprometida. Outros trabalhos também sugerem que a BChE pode contribuir fisiologicamente na hidrólise da acetilcolina em situações especiais, como durante a diferenciação celular e o desenvolvimento embrionário (LAYER *et al.*, 1992) e também hidrolisar o excesso de acetilcolina em regiões importantes como diafragma, músculo cardíaco e cérebro (DUYSEN *et al.*, 2007), evidenciando que essa enzima possui uma função na neurotransmissão.

A butirilcolinesterase também possui papel importante na inativação de compostos prejudiciais ao organismo como os organofosforados (SILVER, 1974;

TAYLOR; RADIC, 1994). Além disso, há envolvimento dessa enzima na desativação da succinilcolina e na conversão de pró-fármacos como o bambuterol em drogas ativas (Tunek *et al.*, 1988). Na *overdose* de cocaína, a enzima de grande importância para a desintoxicação é a BChE, pois ela é capaz de converter a cocaína em derivados menos ativos. Porém, é necessária grande quantidade da enzima para desintoxicar um humano (SUN *et al.*, 2001). SUN *et al.* (2002) produziram uma BChE modificada a partir de modelos computacionais, que apresenta ponto de saturação suficiente para desintoxicar um paciente humano.

Vários fatores foram associados com alterações na atividade da BChE, como os estrógenos, relacionados com a diminuição da atividade da enzima, e outros fatores como peso, índice de massa corporal e obesidade, diabetes do tipo 2 e o fenótipo *CHE2 C₅+*, os quais estão implicados no aumento na atividade da BChE (MIKAMI, 2005).

4.4.1.1 Estrutura Bioquímica da Butirilcolinesterase Humana

A BChE apresenta diversas formas moleculares. Em humanos, há quatro formas principais identificadas por eletroforese de gel de amido que são denominadas C₁, C₂, C₃, C₄ (HARRIS *et al.*, 1962). A forma C₁ é um monômero, a C₂ é um monômero ligado à albumina, C₃ é um dímero e a C₄, forma mais abundante no plasma, é um tetrâmero formado por ligação não-covalente entre dímeros. Nessa forma, cada dímero é constituído por dois monômeros unidos por uma ligação dissulfeto entre os resíduos de Cys571 (LOCKRIDGE *et al.*, 1979; 1987; LOCKRIDGE; LA DU, 1982; MASSON, 1989). Aproximadamente 98% da BChE humana no soro está na forma de tetrâmero com quatro subunidades idênticas (LOCKRIDGE; MASSON, 2000). Esse processo de tetramerização da BChE no soro foi proposto como sendo apoiado por um peptídeo rico em prolina possivelmente derivado da lamelipodina por Li *et al.* (2008). Os autores verificaram a existência de peptídeos ricos em prolina nos tetrâmeros da BChE presentes no plasma sanguíneo. Esses peptídeos, além de dirigirem a formação do complexo C₄, fazem parte do tetrâmero final podendo ser obtidos após desnaturação de C₄. Neste mesmo trabalho, os peptídeos ricos em prolina foram propostos como sendo derivados da proteína Lamelipodina humana. Esta proteína está associada à membrana celular e

participa da protrusão lamelipodial, componente importante no direcionamento celular (KRAUSE *et al.*, 2004).

Masson (1989) propôs outra nomenclatura para as formas moleculares da BChE baseada na sua estrutura molecular. As designações propostas são: G₁, G₂, G₃ e G₄, de acordo com o número de subunidades moleculares. A G₁ corresponde a C₁, a forma globular monomérica. A forma antes denominada C₂ é referida como G₁-ALB, monômero ligado à albumina. G₂ corresponde ao dímero C₃, e G₄ diz respeito ao tetrâmero C₄. O G₃ corresponde ao trímero de mobilidade intermediária entre C₃ e C₄, o qual se forma progressivamente a partir do C₄ submetido à tripsina, plasmina e outras proteases. A figura 13 ilustra as formas moleculares da BChE e possíveis variações.

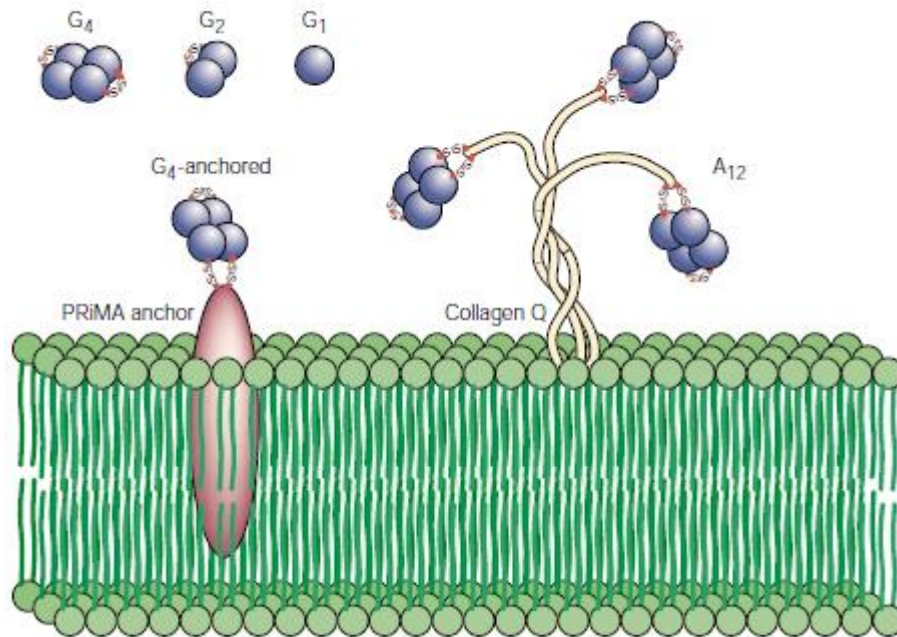


Figura 13 – Formas moleculares da butirilcolinesterase. G₁ é a forma globular solúvel monomérica; G₂ é a forma globular solúvel dimérica e G₄ é a forma globular solúvel tetramérica. A forma G₄-ancorada é um tetrâmero ligado a membrana através da interação com PRiMA (âncora rica em prolina). A₁₂ é uma forma assimétrica em que três tetrâmeros estão ligados à membrana por uma tripla hélice de colágeno Q (DARVESH *et al.*, 2003).

A presença de uma quinta banda (C₅) foi verificada somente em alguns indivíduos e consiste de um tetrâmero ligado a uma substância ainda desconhecida de aproximadamente 60 kDa. O complexo C₅ é determinado pela interação entre os produtos do gene *BCHE* e loco *CHE2* (HARRIS *et al.*, 1962).

O monômero da BChE humana possui peso molecular de 85,534 Da, sendo formado por uma cadeia de 574 resíduos de aminoácidos e nove cadeias laterais de oligossacarídeos ligados a nove asparaginas (LOCKRIDGE *et al.*, 1987). Nachon *et al.* (2002) relataram a estrutura cristalográfica da BChE a partir de uma BChE humana recombinante e ressaltaram a importância dos domínios glicosilados, já que o tetrâmero é altamente glicosilado e a cristalização é então prejudicada. No entanto, esses domínios possuem papel essencial na conformação final da proteína e também em processos de secreção, estabilidade e solubilidade, além de proteção contra a proteólise, contribuindo para um tempo maior na circulação sanguínea.

Em um trabalho de Nicolet *et al.* (2003) foi possível verificar a grande semelhança na estrutura da BChE com a da AChE de *Torpedo californica* (TcAChE) (Figura 14). No entanto, na enzima BChE, os resíduos aromáticos encontrados na entrada do sítio da TcAChE foram substituídos por resíduos hidrofóbicos e no bolso de ligação de grupamento acil foram substituídos os resíduos Phe288 e Phe290 da TcAChE por Leu286 e Val288, respectivamente. Essas diferenças tornam possível a ligação da BChE a uma gama maior de substratos do que a AChE. A conformação da alça acil também apresenta diferenças entre a TcAChE e a BChE.

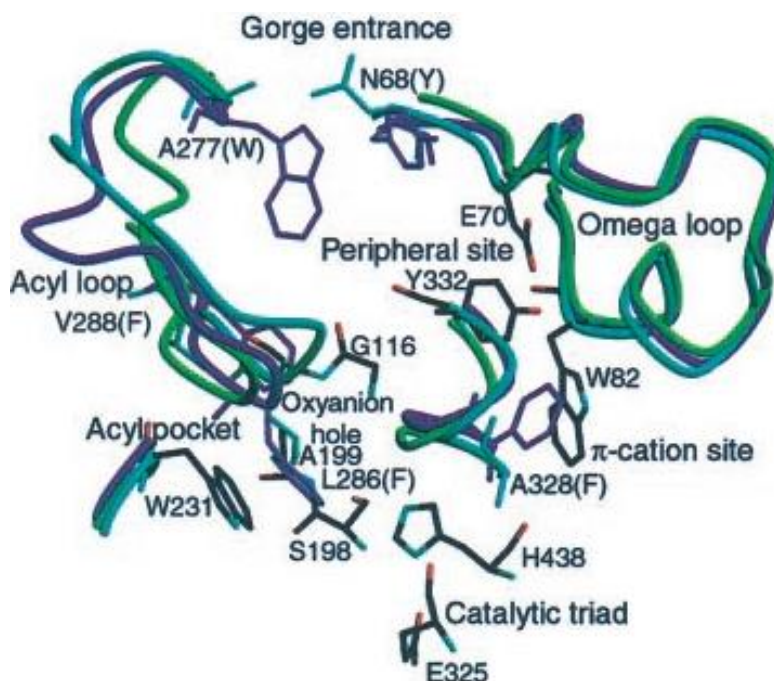


Figura 14 – Superposição da BChE nativa (azul claro), TcAChE (roxo) e a AChE de *Drosophila melanogaster* (verde) na região da entrada do sítio ativo (NICOLET *et al.*, 2003).

O sítio ativo da BChE humana é constituído por um sítio esterásico e um sítio aniônico, sendo composto por aproximadamente 55 aminoácidos no total. O sítio aniônico possui dois locais de ligação de substrato que são conectados por uma alça ômega (Ω), o Asp70 no sítio aniônico periférico e Trp82 no sítio ativo. A ativação do substrato da BChE envolve diferentes domínios da entrada do sítio ativo da enzima, como o sítio aniônico periférico (Asp70 e Tyr332), o sub-sítio de ligação do sítio ativo (Trp82 e Ala328), o resíduo estabilizador Glu197 e o resíduo Asn83 da alça Ω (MASSON *et al.*, 2001).

Boberg *et al.* (2010) demonstraram que embora indivíduos obesos possuam atividade da BChE significativamente maior que não-obesos, as proporções entre as formas moleculares da BChE são mantidas, sugerindo que esta proporção é regulada e, portanto, importante para o papel da BChE no metabolismo. Em concordância, estudo de Silva *et al.* (2012) revelou que embora a atividade da BChE plasmática diminua após 12 semanas de exercício físico praticado por adolescentes obesos, as formas moleculares mantêm suas proporções. Em estudo feito por Alcântara *et al.* (2005), foram encontradas doze bandas da BChE plasmática em eletroforese em gel de poliacrilamida, das quais oito provavelmente representam formas heterólogas em que a BChE se liga a outras substâncias como a albumina, a α -2-macroglobulina, a transferrina e outras moléculas ainda não identificadas.

4.4.2 O gene *BCHE*

O estudo de Arpagaus *et al.* (1990), mostrou evidências de que apenas um gene é responsável por codificar a enzima BChE. O gene *BCHE* (3q26.1-q26.2) tem 64.558 kb e possui quatro exons formados por 2.445 pares de bases. Visto que a BChE possui 574 resíduos de aminoácidos, 1722 pares de bases codificam para a enzima madura e os 723 pares de bases não codificantes correspondem ao exon 1, à parte inicial do exon 2 e à parte final do exon 4. Assim, o primeiro códon que codifica para o peptídeo maduro está localizado no exon 2 (Figura 15).

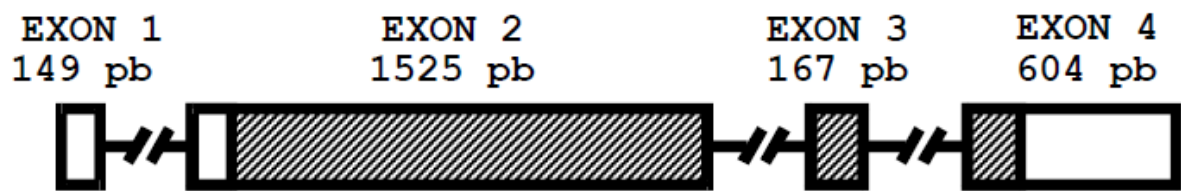


Figura 15 – Desenho esquemático do gene *BCHE* com o número de pares de bases de cada um dos quatro exons. A região hachurada corresponde à proteína madura (FURTADO-ALLE, 2005).

O exon 1 (149 pb) contém seqüências não traduzidas, e dois potenciais sítios de início de tradução nos códons -69 e -47. O exon 2 (1525 pb) contém 83% da seqüência codificadora da proteína madura, incluindo a extremidade N-terminal, o sítio ativo e um terceiro possível sítio de início da tradução no códon -28. O exon 3 possui 167 pb e o exon 4 (604 pb) codifica a extremidade C-terminal da proteína e apresenta a região 3' não traduzida que possui dois sinais de poliadenilação (Figura 9) (Arpagaus *et al.*, 1990).

O mRNA da BChE humana possui 40,24% de C+G, que é, aproximadamente, a proporção dessas bases no genoma humano. Comparações entre proteínas colinérgicas de mamíferos e aves, (BChE, AChE, receptores nicotínicos e muscarínicos de acetilcolina e colina acetiltransferase) evidenciaram que o gene *BCHE* possui um conteúdo menor de C+G em relação à outras proteínas colinérgicas. O conteúdo de C+G é importante para regulação transcricional, pois o genoma de animais homeotermos pode ser dividido em domínios com conteúdos altos e baixos de C+G chamados de isocoros. Durante a evolução, a posição dos genes em isocoros manteve-se conservada. Isso pode ser comprovado no gene da BChE humana e de coelho que conservam o reduzido conteúdo de C+G (CHATONNET; LOCKRIDGE, 1989).

Apesar do gene *BCHE* não apresentar uma seqüência consenso TATA box, a região regulatória a montante do gene apresenta homologia com fatores de iniciação encontrados em outros genes sem essa seqüência. O sequenciamento dessa região permitiu a identificação de vários sítios de ligação para fatores de transcrição que poderiam promover a sua expressão no início do desenvolvimento e durante a proliferação celular (JBILLO *et al.*, 1994).

4.4.2.1 Variabilidade do Gene *BCHE*

Mais de 65 variantes já foram descritas para o gene *BCHE* (Souza *et al.*, 2005). A variabilidade genética da BChE foi verificada pela primeira vez em pacientes que sofriam de apnéia e paralisia muscular prolongadas quando submetidos a doses farmacológicas de succinilcolina, um bloqueador neuromuscular despolarizante pré-operatório (KALOW; GENEST, 1957). Os inibidores DL-propranolol e Ro2-0683 [dimetilcarbamato de brometo de (2-hidroxi-5-fenil-benzil) trimetil amônio] e acetato de α -naftila como substrato (ALCÂNTARA *et al.*, 1991; PICHETH *et al.*, 1994) possibilitaram a classificação de algumas variantes do gene *BCHE*. Dibucaína e fluoreto de sódio também são inibidores que foram utilizados para evidenciar variantes fenotípicas. No entanto, através do sequenciamento do gene *BCHE* (ARPAGAUUS *et al.*, 1990) foi possível identificar uma gama maior de variantes desse gene.

A variante da BChE mais frequentemente responsável pela resposta prolongada de relaxamento muscular após a administração intravenosa de doses farmacológicas de succinilcolina é aquela resistente à dibucaína, chamada atípica. Essa enzima tem afinidade reduzida por ésteres de colina. Um estudo de McGuire *et al.* (1989) identificou o alelo A, responsável pelo fenótipo atípico da BChE, como sendo uma mutação de ponto no nucleotídeo 209 que altera o códon 70 de GAT para GGT (Asp70→Gly; *D70G*). Visto que o resíduo Asp70 é um local de ligação de substrato no sítio aniônico periférico da BChE, a substituição desse aminoácido por outro aminoácido neutro (Asp→Gly) resulta em uma redução na afinidade por ésteres de colina (MASSON *et al.*, 2001). A frequência estimada do alelo *D70G* para a população caucasóide da América do Norte é cerca de 2% (MCGUIRE *et al.*, 1989), enquanto que para a população de Curitiba é de 1,80%, em doadores de sangue Euro-brasileiros (MIKAMI, 2005).

Outra variante muito estudada corresponde à enzima K, determinada por uma mutação de ponto de guanina por adenina no nucleotídeo 1615 (G→A), resultando na substituição de Ala539 por Thr (*A539T*; BARTELS *et al.*, 1992). A variante K foi assim denominada devido ao Professor Werner Kalow, um dos fundadores da farmacogenética, o mesmo que verificou pela primeira vez a ocorrência de apnéia prolongada em pacientes submetidos à succinilcolina (LAM *et al.*, 2009). Bartels *et al.* (1992) encontraram essa mutação em 90% dos genes que continham a mutação

de ponto *D70G* responsável pelo fenótipo atípico da BChE. De acordo com o estudo, a presença conjunta das mutações K e A na mesma molécula não altera qualitativamente a enzima variante atípica, mas pode estar relacionada a uma redução de cerca de um terço da $V_{\text{máx}}$ da atividade dessa enzima. Rubinstein *et al.* (1978) foram os primeiros pesquisadores que descreveram a variante K e constataram originalmente que essa variante estava associada com menor número de moléculas na circulação, em torno de 33%. Altamirano *et al.* (2000) relataram que a mutação *A539T* parece não ter nenhum efeito na estrutura ou atividade da BChE visto que a enzima K não apresenta diferenças com a BChE usual ou selvagem em relação à afinidade e taxa de catálise de substratos, taxa de secreção da célula e formação de tetrâmeros. De acordo com esse estudo, a redução de 33% no número de moléculas circulantes da BChE associado ao fenótipo K pode ser causado por mutações na região regulatória ou promotora do gene *BCHE*. Dentre as variantes não-usuais da BChE, o alelo *A539T* é o mais freqüente tendo freqüência de 18,4% e 17,1% em brasileiros brancos e miscigenados respectivamente (SOUZA *et al.*, 1998). De acordo com Podoly *et al.* (2009), a atividade reduzida da variante K tem uma origem estrutural na formação do tetrâmero, tornando-a menos estável do que a enzima usual e prejudicando a capacidade em atenuar a formação de fibrilas na doença de Alzheimer.

A mutação *-116A* é consequência da substituição de G por A na posição -116 do exon 1 do gene *BCHE*, região transcrita mas não traduzida do gene. A frequência populacional da variante *-116A* descrita por BARTELS *et al.* (1990) é de 8% em norte americanos. Em caucasóides de Curitiba a frequência alélica para *-116A* é de 8,8% (FURTADO, 2005). Essa variante se encontra em desequilíbrio de ligação com a variante *1615A (A539T)* ($D = 91,2\%$; BARTELS *et al.*, 1990; FURTADO-ALLE *et al.*, 2008). Estudo de Furtado-Alle *et al.* (2008) constatou que a redução na atividade da BChE antes atribuída à presença da mutação *1615A* deve-se a presença conjunta da *1615A* com *-116A*, pois quando apenas a mutação *1615A* está presente, não há alteração na atividade da BChE. Os autores sugerem que a mutação *-116A* pode interferir na ligação de elementos reguladores da transcrição e/ou tradução do gene *BCHE*, já que a região 5' UTR do mRNA inclui a região -116.

O polimorfismo *1914 (-1914G)* encontra-se 189 bases depois do códon stop no exon 4 do gene *BCHE*, região não codificadora. Esta mutação foi descrita com

frequência de 26% e encontra-se em desequilíbrio de ligação com a variante -116A e com a 1615A, exibindo configuração em cis (Bartels *et al.*, 1990). A presença desse desequilíbrio de ligação sugere que a redução na atividade da BChE pode ser atribuída à interação entre tais variantes.

4.4.3 O loco *CHE2*

Harris *et al.* (1963a) identificaram uma banda denominada C₅ em eletroforese bidimensional em papel e gel de amido. A banda foi encontrada em 4,6% da amostra e o loco responsável por sua determinação foi chamado de *CHE2*. O loco *CHE2* apresenta os alelos *CHE2* C₅⁺ e *CHE2* C₅⁻ que indicam, respectivamente, a presença e a ausência da banda C₅. Em amostra da população de Curitiba, o fenótipo *CHE2* C₅⁺ foi encontrado com frequência de 10,3% em trabalho realizado por Chautard-Freire-Maia *et al.* (1991). De acordo com Sugimori (1986), indivíduos *CHE2* C₅⁺ são menos sensíveis à succinilcolina que os indivíduos *CHE2* C₅⁻. Indivíduos com o fenótipo *CHE2* C₅⁺ apresentam atividade média da BChE cerca de 30% mais elevada do que a atividade em indivíduos *CHE2* C₅⁻ (HARRIS, 1980).

Estudo feito por Chautard-Freire-Maia (1991) demonstrou que os indivíduos *CHE2* C₅⁺ têm em média menor peso do que os indivíduos *CHE2* C₅⁻. De forma semelhante, Alcântara *et al.* (2001) verificou que a média de IMC dos indivíduos *CHE2* C₅⁺ é menor do que a média daqueles com fenótipo *CHE2* C₅⁻, sugerindo a influência do loco *CHE2* no metabolismo de lipídeos. Além disso, o fenótipo *CHE2* C₅⁺ é menos frequente em obesos do que em controles de peso normal em trabalho realizado por Furtado (2005), o qual também propôs um efeito protetor desse fenótipo em relação à obesidade.

A banda C₅, que condiciona uma substância desconhecida, é determinada pelo gene *BCHE* e pelo loco *CHE2*. Há independência entre os alelos do gene *BCHE* e a banda C₅ (HARRIS *et al.*, 1963b). Scott e Powers (1974) propuseram uma associação entre a BChE e uma proteína codificada pelo loco *CHE2* como sendo responsável pela provável formação da banda C₅. Masson (1991) sugere que a banda C₅ seja uma banda híbrida, formada pela banda C₄ associada à outra proteína (X). O peso molecular da C₅ é 60 kDa maior que o peso da C₄, essa diferença pode ser atribuída à proteína X. Após tratamento com tripsina e altas concentrações de sal, há dissociação de C₅ originando a C₄. Por outro lado, após

ação de agentes redutores e pressão de 3,5 kbar, a banda C₅ não se dissocia. Esse experimento indica que C₅ é formada pela associação de C₄ com a proteína X através de ligações não covalentes e com predomínio de interações iônicas. A análise de géis corados de eletroforeses de plasmas *CHE2 C5+* incubados por 30 minutos em soluções tamponadas de bambuterol (agonista β 2 e inibidor específico da BChE) mostrou curvas de inibição paralelas para C₄ e C₅. Essas curvas demonstraram que a banda C₅ não é um híbrido de AChE/BChE (MASSON, 1991).

Trabalho feito por Li *et al.* (2008), sugere que o componente protéico desconhecido e não covalentemente associado a BChE em sua forma C5 (fenótipo *CHE C5+*) pode ser uma forma atípica da lamelipodina, resultante do mal funcionamento de alguma protease no soro ou fígado responsável por clivá-la, deixando-a com um tamanho maior em relação à lamelipodina presente no complexo C4. Os autores argumentam com base em que o gene que codifica esta proteína desconhecida está localizado no cromossomo 2 (2q33-q35) e o gene humano da lamelipodina (*RAPH1*) também encontra-se na mesma região cromossômica.

AKIZUKI *et al.* (2004) analisaram o gene *BCHE* e não verificaram associação entre variantes do gene *BCHE* e o fenótipo *CHE2 C5+*, propondo que não há relação entre o aumento da atividade da BChE, verificado em indivíduos *CHE2 C5+*, e as variantes do gene.

4.5 A DOENÇA DE ALZHEIMER E A BUTIRILCOLINESTERASE HUMANA

A butirilcolinesterase é expressa em neurônios do cérebro humano sendo que as principais regiões envolvidas são a amígdala, hipocampo e tálamo (DARVESH *et al.*, 2003). Estudos sugerem que a BChE pode desempenhar um papel constitutivo na hidrólise da acetilcolina, podendo atuar como um co-regulador da neurotransmissão colinérgica (GIACOBINI, 2003; DARVESH *et al.*, 2003; CERBAI *et al.*, 2007). Experimento de Cerbai *et al.*, (2007) demonstra que a inibição parcial da BChE por PEC (*N1phenethyl-norcymserine*) é suficiente para elevar a acetilcolina a níveis comparáveis com os obtidos com inibidor da acetilcolinesterase em ratos. A elevação dos níveis de acetilcolina pela inibição da BChE, corrobora com a hipótese de que essa enzima pode ser um importante regulador da atenção.

A atividade da BChE aumenta a partir dos 60 anos de idade e também na doença de Alzheimer. Há várias interações potenciais entre a BChE e a apoE. Ambas proteínas são produzidas no fígado e secretadas para a circulação. Não somente a apoE, mas muito provavelmente a BChE também, interage com lipoproteínas. Além disso, as duas proteínas são encontradas em astrócitos e outras células gliais, a BChE em oligodentrócitos e a apoE na microglia. BChE e apoE ocorrem nas placas amiloides da doença de Alzheimer e nos emaranhados neurofibrilares (LEHMANN *et al.*, 1997). Estudos de fibrilização do beta-amiloide *in vitro* mostraram que a BChE atua como modulador no processo. Conforme suas diferentes variantes, a BChE pode reduzir ou aumentar a taxa de formação de fibrila. Reatividade maior da BChE foi observada em placas senis da doença de Alzheimer em comparação com o cérebro normal, sugerindo que a BChE poderia facilitar a formação da placa senil da doença (BIZZARRO *et al.*, 2010). Dessa forma, a inibição dessa enzima no tratamento da doença pode não somente aumentar a disponibilidade de acetilcolina na sinapse como também reduzir o número de placas senis formadas (CERBAI *et al.*, 2007). A inibição da BChE, além da AChE, no tratamento da DA pode melhorar a neurotransmissão colinérgica (GIACOBINI, 2003), principalmente nas fases avançadas da doença em que há redução significativa da atividade da AChE e a BChE atua compensando essa deficiência com níveis mais elevados (RADCHENKO *et al.* 2012). Foi demonstrado que, inibidores seletivos da BChE aumentam os níveis de acetilcolina no cérebro e melhoram a cognição em roedores, além de não apresentarem os efeitos colaterais clássicos dos inibidores da AChE. Diante disso, o desenvolvimento de inibidores seletivos da BChE ou de ambas as colinesterases é uma estratégia importante para melhorar a qualidade de vida dos pacientes com DA, principalmente nos casos mais graves (GIACOBINI, 2004). Duysen *et al.* (2007) demonstraram que, em ratos *knockout* para a BChE, ocorre um aumento na sensibilidade a inibidores da acetilcolinesterase, sugerindo que pessoas com deficiência nessa enzima podem ser intolerantes a doses padrão de donepezil.

4.5.1 A doença de Alzheimer e a variante K do gene *BCHE*

De acordo com Podoly *et al.* (2009), a BChE-K é instável e possui a organização da estrutura quaternária comprometida quando comparada com a

BChE selvagem, resultando em redução na atividade hidrolítica e manutenção prolongada dos níveis de acetilcolina, funcionando como um fator de proteção para a DA. No entanto, outros achados demonstraram que a variante K é menos eficiente em atenuar a formação de fibrilas, tendo assim papel importante na progressão da doença de Alzheimer (Diamant *et al.*, 2006). Dessa forma, esta variante pode atuar como um fator de risco ou de proteção para a doença (Podoly *et al.*, 2009).

Os resultados de Lehmann *et al.* (1997) são consistentes com a hipótese de que a variante K do gene *BCHE* (*BCHE-K*) está associada com aumento no risco de DA de início tardio em portadores do alelo *APOE* $\epsilon 4$, propondo assim um sinergismo entre a variante K e o alelo $\epsilon 4$. Lehmann *et al.* (2001) identificaram através de meta-análise uma verdadeira associação entre a DA e a *BCHE-K* em homens portadores do *APOE* $\epsilon 4$ com idade acima de 75 anos. Raygani *et al.* (2004) também demonstraram que a variante K do gene *BCHE* e o alelo $\epsilon 4$ do gene *APOE* atuam sinergisticamente para aumentar o risco da doença de Alzheimer de início tardio em indivíduos do Tehran, Irã, com idade inferior a 75 anos. Os pesquisadores relataram que a variante K é um fator de risco para a doença de Alzheimer de início tardio (acima dos 75 anos), enquanto que o alelo $\epsilon 4$ é considerado um fator de risco para indivíduos com idade inferior a 75 anos na população do Tehran. A discrepância verificada entre os dados de outros estudos pode ser devido à baixa expectativa de vida da população Iraniana quando comparada com as demais populações (RAYGANI *et al.*, 2004).

Em desacordo, Singleton *et al.* (1998) e Grubber *et al.* (1999) não encontraram evidência significativa para a associação entre *BCHE-K* e a DA. Yamamoto *et al.* (1999) também obtiveram resultados que não sustentam a hipótese da *BCHE-K* como fator de risco para a DA, em indivíduos Japoneses, independentemente da presença do alelo *APOE* $\epsilon 4$. Em outro estudo realizado por Bizzarro *et al.* (2010) com indivíduos italianos, nenhuma associação positiva entre a variante K do gene *BCHE* e a doença de Alzheimer foi observada. Ao contrário disso, foi encontrada baixa frequência significativa dessa variante em pacientes com DA quando comparado com controles saudáveis e indivíduos com demência fronto-temporal, sugerindo assim um efeito protetor da *BCHE-K*. O estudo não confirmou o efeito sinérgico entre a *BCHE-K* e o alelo $\epsilon 4$. Resultados controversos podem refletir a diferente distribuição da *BCHE-K* nas etnias e/ou uma ligação distinta dessa

variante com um gene próximo de susceptibilidade para a DA, ainda não identificado, em diferentes populações (RAYGANI *et al.*, 2004).

No Brasil, estudo caso-controle de Simão-Silva *et al.* (2013) não encontrou diferenças significativas nas frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas para as variantes K e -116A do gene *BCHE*. Apesar disso, os autores sugerem que, de acordo com os resultados, a variante -116A pode ter um efeito protetor sobre a doença.

Alguns pesquisadores também têm relatado a influência da variante K na resposta ao tratamento para a DA. Patterson *et al.* (2011) realizou um estudo com 165 pacientes com DA em tratamento com inibidores de colinesterase afim de verificar o efeito da apolipoproteína E e da butirilcolinesterase na resposta ao tratamento com essas drogas. Os autores observaram que a presença do alelo $\epsilon 4$ do gene *APOE* estava associada com a resposta cognitiva precoce (3 a 9 meses) e tardia (9 a 15 meses) aos inibidores de colinesterase nos pacientes com DA leve (MEEM ≥ 21). Já na DA moderada à grave (MEEM ≤ 15), a presença da variante K do gene *BCHE* foi associada com a resposta tardia ao tratamento com inibidor. O estudo sugeriu então, que testes para genotipagem do gene *BCHE* e *APOE* podem ser úteis para direcionar a estratégia terapêutica no paciente com DA. Bullock *et al.* (2006) e Blesa *et al.* (2006) verificaram que pacientes com idade inferior a 75 anos não portadores da BChE-K obtiveram melhor resposta ao tratamento com rivastigmina do que com donepezil.

5. ARTIGO

Butyrylcholinesterase: *K* variant, plasma activity, molecular forms and rivastigmine treatment in Alzheimer's disease

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder in which there is a decline of cholinergic function. The symptomatic AD treatment involves the use of ChEIs (cholinesterase inhibitors) as rivastigmine, a dual inhibitor of acetylcholinesterase (AChE) e butyrylcholinesterase (BChE). The human butyrylcholinesterase is an enzyme that has specific roles in cholinergic neurotransmission and it has been associated with AD. In the serum, BChE is found in four main molecular forms: G1 (monomer); G1-ALB (monomer linked to albumin); G2 (dimer) and G4 (tetramer). The interaction between the products of *BCHE* gene and *CHE2* locus results in *CHE2* C5+ and *CHE2* C5- phenotypes. *CHE2* C5+ phenotype and BChE-K are factors that influence on BChE activity. This work aimed to verify the proportions of BChE molecular forms, total and relative activity in 139 AD patients and 139 elderly controls, taking into account *K* variant, *CHE2* locus, rivastigmine treatment and clinical dementia rating (CDR) of AD patients. Phenotypic frequencies of *CHE2* C5+ and frequency of the carriers of the *K* allele were similar between groups. Total BChE activity in plasma was significantly lower in AD patients than in elderly controls. Furthermore, we found that reduction on plasma BChE activity is associated directly with AD progression in AD patients and that rivastigmine treatment has stronger effect in BChE activity within CDR2 group. The reduction in BChE activity did not occur proportionally in all molecular forms. Multiple regression analysis results confirmed that AD acts as main factor in plasma BChE activity reduction and that severe stages are related with an even greater reduction. These finds suggest that the reduction of total plasma BChE and relative BChE molecular forms activity in AD patients is probably associated with a feedback mechanism and provides a future perspective of using this enzyme as a possible plasmatic secondary marker for AD.

Keywords: Alzheimer's disease; butyrylcholinesterase; *K* variant; loco *CHE2*; BChE molecular forms.

1. INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder and the most common cause of dementia. It is characterized pathologically by the presence of amyloid plaques and neurofibrillary tangles in brain besides decline of cholinergic function. The cholinergic deficits in AD are strongly correlated with cognitive impairment (Roberson; Harrell, 1997) which led to the formulation of the "cholinergic hypothesis" (Davies; Maloney, 1976). This hypothesis states that the inability to transmit neurologic impulses across brain synapses is the cause of cognitive, global, and behavioral dysfunction associated with dementia (Ladner; Lee, 1998).

Cholinesterases (ChE) are a family of enzymes that catalyze the hydrolysis of acetylcholine (ACh) into choline and acetic acid, an essential process for the restoration of the cholinergic neuron. There are two cholinesterases types: acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8). Both enzymes participate in cholinergic neurotransmission by hydrolyzing acetylcholine in central and peripheral nervous system (Pohanka, 2011).

Based on cholinergic deficits in AD, cholinesterase inhibitors (ChEIs) are the first-line drugs in the symptomatic treatment of AD by inhibiting cholinesterase and thus resulting in increased synaptic levels of acetylcholine neurotransmitter. Currently the most prescribed ChEIs are donepezil, galantamine and rivastigmine. These drugs are commonly used to treat patients with mild-to-moderate AD (Qaseem et al., 2008) although Ferris et al. (2013) *post-hoc* analysis reinforce that rivastigmine may be an effective therapy in the treatment of severe AD. Individual ChEI differ from each other with respect to their pharmacologic properties. Donepezil and galantamine are short-acting reversible competitive inhibitors, whereas rivastigmine is actively metabolized by cholinesterase, thus making it an intermediate-acting or 'pseudo-irreversible' inhibitor with an intermediate duration of action (Jann et al., 2002). Although the primary target of these agents is acetylcholinesterase (donepezil and galantamine), rivastigmine shows equal affinity for both AChE and BChE enzymes (Jann et al., 2002). These agents do not stop disease progression, but clinical studies have shown that they temporarily stabilize cognitive impairment and help to maintain global function, often delaying the need for patient placement in nursing homes by several months (Michaelis, 2003).

Human butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) is the secondary acetylcholine (ACh)-hydrolyzing enzyme encoded by *BCHE* gene (3q26.1-q26.2) (Arpagaus et al., 1990) and it is found with the neurofibrillary tangles and amyloid plaques of AD (Gómez-Ramos; Morán, 1997), which suggests that it functions as a potential modulator in the process. BChE is synthesized in the liver and distributed to several parts of the organism, including brain (Wescos et al., 1947). The butyrylcholinesterase activity is increased in elderly brain (60-90 years) (Perry et al., 1978) and in AD patients brain, mainly in the hippocampus and temporal cortex, suggesting a relationship with the loss of episodic memory in AD (Arendt et al., 1992; Perry et al., 1978) and cognitive decline in dementias (Perry et al., 2003), respectively. Acetylcholinesterase (AChE) activity, however, is reduced in AD brain and there was no correlation between age and AChE activity (Perry et al., 1978). Studies suggest that BChE may therefore participate in the transformation of beta-amyloid (A β) from an initially benign form to an eventually malignant form associated with neuritic tissue degeneration and clinical dementia (Darvesh et al., 2011; Guillozet et al., 1997). However, other researchers found that BChE attenuates amyloid fibril formation and its presence in amyloid plaques implies that this enzyme incorporates into A β fibrils at a late phase of their formation (Diamant et al., 2006; Podoly et al., 2010).

In the serum, BChE is found in four main molecular forms: G1 (monomer); G1-ALB (monomer linked to albumin); G2 (dimer) and the most common form, G4 (tetramer) (Masson, 1979). Additionally, the interaction between BChE tetramer and a protein encoded by *CHE2* locus (2q33-35) results in a complex named C5 band, identified in electrophoresis only in 10.3% of a Southern Brazilian population (Chautard-Freire-Maia et al., 1991). The *CHE2* C5+ and *CHE2* C5- phenotypes correspond to the presence and absence of the band, respectively (Harris et al., 1962). *CHE2*C5+ individuals have BChE activity approximately 30% higher than individuals *CHE2*C5- (Chautard-Freire-Maia et al., 1991). Over 65 genetic variants were described for *BCHE* gene (Souza et al., 2005), and the BChE K variant (BChE-K; 1615A; rs1803274) is the most studied as a risk factor for AD and it was primarily associated with 33% reduction of BChE molecules in plasma (Rubinstein et al., 1978).

Considering the debate about the change in BChE expression and hydrolytic activity and the role on AD neuropathology, this work aims to verify the proportions of BChE molecular forms (G1, G1-ALB, G2 and G4), total and relative activity in AD patients and elderly controls, taking into account K variant and *CHE2* locus. Moreover, this study has the purpose to assess the total and molecular forms activity of butyrylcholinesterase in AD patients treated and not treated with rivastigmine at different stages of the disease.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Sample

Blood samples were collected from 139 patients with Alzheimer disease from Clinical Hospital of the Federal University of Paraná (HC-UFPR) and Curitiba Neurology Institute (INC); and 139 elderly controls cognitively healthy, both groups constituted mainly of euro-Brazilian from Southern Brazil. All subjects read, accepted and signed the term of informed consent. This study was previously approved by the ethical committee from HC-UFPR under registration 1192.117.11.08. The AD patients were diagnosed according to the NIA-AA (*National Institute on Aging and Alzheimer's Association*) criteria for probable AD (McKhann et al., 2011). Clinical Dementia Rating (CDR) originally developed by Hughes et al. (1982) and adapted by Morris (1993) was used to classify the degree of dementia in mild (CDR1), moderate (CDR2) and severe (CDR3). The control group was screened by neuropsychological tests and submitted to an evaluation of impairment of daily activities, and then selected according to reference values for the corresponding age group.

2.2 Laboratory analysis

The samples were coded and processed to obtain the plasma. Plasma BChE activity was measured using propionylthiocholine as substrate at 25°C as the protocol of Dietz *et al.* (1972) modified by Evans and Wroe (1978). Locus *CHE2* phenotypes were identified by acid agar gel electrophoresis (pH: 6.50) (Van Ros; Vervoot, 1973). The detection of BChE bands in plasma was made according to Boberg *et al.* (2010). Relative Intensity (RI) of each band was measured using KODAK 1D Image Analysis Software, and the relative activity (RA) of each band (G1, G1-ALB, G2 and G4) was the result of multiplication of total BChE plasma activity by the RI of each band

detected in the polyacrylamide gel. DNA extraction was performed by a salting-out method (Lahiri; Nurnberger, 1991) and then diluted to a final concentration of 20 ng/ μ L. Genotyping of *K* variant (rs1803274) was obtained by TaqMan SNP Genotyping Assay according to Simão-Silva *et al.* (2013).

2.3 Statistical analysis

Allele and genotype frequencies of the *K* variant and phenotype frequencies of the *CHE2* locus were obtained by direct counting and compared between groups with χ^2 test with assistance of Clump program (Clump; Curtis, 1995). Kolmogorov–Smirnov test was used to test for normality of variables distribution. The comparisons between means were performed by t-test (parametric variables) or by Mann-Whitney test (non- parametric variables). Multiple regression analysis was performed to evaluate the independent effect of variables. A 5% level of significance was adopted for all the statistical analyses performed.

3. RESULTS

3.1 Sample characterization

Patients and elderly controls characteristics are shown in table 1. Women-men ratio were similar in patients and control group ($\chi^2 = 2.53$, $p = 0.11$). The patient group was compound of 52 men and 87 women. In the rivastigmine treated patients group ($n = 37$), all individuals treated with this drug were included. In the no-rivastigmine treated group ($n = 99$), all patients who were not taking this drug, while under treatment with another type of ChEIs or memantine were included.

Table 1 – Means \pm Standard Deviations (S.D.) for age, years of schooling and Mini Mental State Examination (MMSE) scores in patients and controls and p values for comparisons between means.

	PATIENTS n = 139	CONTROLS n = 139	
	Mean \pm S.D.	Mean \pm S.D.	<i>p</i> **
Age*	72.16 \pm 9.54	71.17 \pm 8.08	0.37
Years of schooling	5.99 \pm 5.08	7.13 \pm 4.9	0.06
MMSE	14.33 \pm 8.29	27.09 \pm 2.39	0.00

* Patients age was determined according to the age of onset of AD symptoms ($n = 116$).

** *t*-test for parametric variable; Mann-Whitney U test for non-parametric variable.

3.2 Case-control study: AD patients x Controls

Table 2 shows that mean total BChE activity in plasma was significantly higher in elderly controls ($6.45 \text{ KU/L} \pm 1.49$) than in patients with AD ($5.52 \text{ KU/L} \pm 1.54$; $t = 5.17$, $p = 4.49 \times 10^{-7}$) as the relative mean activity of G4, G1-ALB and G1 bands. Means total BChE activity and relative activity of G4 and G1 BChE bands remained significantly lower in patients than in controls even when only no-rivastigmine treated patients were considered ($p = 0.0016$; $p = 0.0056$; $p = 0.0095$, respectively). The reduction in BChE activity did not occur proportionally in all molecular forms, since the dimer showed no significant difference in activity in patients and controls.

Table 2 – Means \pm Standard Deviations (S.D.) and p value of total BChE activity (ATV) and relative activity of BChE bands (G4, G2, G1-ALB and G1) in patients and controls.

	PATIENTS n = 139	CONTROLS n = 139	
	Mean (KU/L) \pm S.D.	Mean (KU/L) \pm S.D.	p (t -test)
ATV	5.52 ± 1.54	6.45 ± 1.49	4.49×10^{-7}
G4	3.24 ± 0.93	3.78 ± 1.06	9.17×10^{-6}
G2	0.77 ± 0.36	0.84 ± 0.54	0.1100
G1 – ALB	0.73 ± 0.38	0.87 ± 0.39	0.0028
G1	0.78 ± 0.45	0.97 ± 0.49	0.0008

Frequencies of locus *CHE2* phenotypes and of carriers of the *K* allele were similar between patients and controls ($\chi^2 = 0.46$, $p = 0.50$ and $\chi^2 = 0.63$, $p = 0.43$, respectively). The genotype distributions were in Hardy–Weinberg equilibrium.

Since mean total BChE activity was significantly higher in control group than in AD patient group, a multiple regression analysis was performed considering AD presence, sex, *CHE2* phenotype, *K* variant presence and rivastigmine treatment as independent variables and total BChE activity as the dependent variable. These results confirmed that AD and *K* variant are independent factors for decreasing total BChE activity in plasma ($\beta = 0.29 \pm 0.06$, $p = 2.43 \times 10^{-6}$; $\beta = 0.19 \pm 0.06$, $p = 0.0018$, respectively).

Whereas significant difference was found between the means of molecular forms activity in patients and controls, it was performed another regression analysis considering each molecular form as a dependent factor. Thus, concerning the G1

and G1-ALB, both AD and *K* variant act as independent factors in the decrease of activity. On the other hand, considering G4 as the dependent variable, only AD is a significant factor in the decrease of tetramer activity ($\beta = 0.28 \pm 0.06$, $p = 7.09 \times 10^{-6}$). Regarding the dimer, only *K* variant acts in the decrease of this molecular form activity ($\beta = -0.17 \pm 0.06$, $p = 0.0053$).

3.3 Patients study: Rivastigmine treated x No-rivastigmine treated and AD progression

Table 3 shows means of MMSE score, total BChE activity and relative activities of BChE bands (G4, G2, G1-ALB and G1) in each CDR group. The means of MMSE scores were significantly different between CDR1 and CDR2 ($t = 5.71$; $p = 1.37 \times 10^{-7}$); CDR1 and CDR3 ($t = 14.83$; $p = 1.5 \times 10^{-25}$) and CDR2 and CDR3 ($t = 8.31$; $p = 1.23 \times 10^{-12}$). Means of total activity were significantly different only between CDR1 and CDR3 ($t = 2.47$; $p = 0.015$) and the same was true for means of relative activity of G4 ($t = 2.47$; $p = 0.016$) and G1 ($t = 2.61$; $p = 0.011$).

Table 3 – Means \pm Standard Deviations (S.D.) of MMSE scores, total BChE activity (ATV) (KU/L) and relative activity of BChE bands (G4, G2, G1-ALB and G1) (KU/L) within each CDR patients group.

	CDR1 n = 48	CDR2 n = 47	CDR3 n = 41
	Mean \pm S.D.	Mean \pm S.D.	Mean \pm S.D.
MMSE	21.23 \pm 4.79	15.11 \pm 5.64	5.37 \pm 5.30
ATV	5.88 \pm 1.39	5.54 \pm 1.63	5.11 \pm 1.56
G4	3.39 \pm 0.93	3.33 \pm 1.02	2.94 \pm 0.77
G2	0.79 \pm 0.32	0.74 \pm 0.40	0.79 \pm 0.38
G1-ALB	0.77 \pm 0.35	0.73 \pm 0.41	0.70 \pm 0.38
G1	0.93 \pm 0.47	0.74 \pm 0.41	0.67 \pm 0.46

Mean total BChE activity and mean relative activity of G4, G2 and G1-ALB BChE bands were significantly higher in the no-rivastigmine treated patients than in the rivastigmine-treated patients. The means of MMSE scores were not different between rivastigmine-treated and no-rivastigmine treated patients (table 4).

Table 4 – Means \pm Standard Deviations (S.D.) of total BChE activity (ATV), relative activity of BChE bands (G4, G2, G1-ALB and G1) and MMSE scores in rivastigmine-treated patients (RVG) and no-rivastigmine treated patients (No-RVG).

	RVG n = 37	NO-RVG n = 99	
	Mean (KU/L) \pm S.D.	Mean (KU/L) \pm S.D.	<i>p</i> (<i>t</i> -test)
MMSE	14.27 \pm 8.18	14.47 \pm 8.34	0.9000
ATV	4.76 \pm 1.52	5.84 \pm 1.45	0.0002
G4	2.82 \pm 0.85	3.41 \pm 0.92	0.0009
G2	0.64 \pm 0.30	0.82 \pm 0.37	0.0067
G1 – ALB	0.59 \pm 0.35	0.79 \pm 0.38	0.0054
G1	0.72 \pm 0.54	0.82 \pm 0.42	0.2600

There were no significantly differences in mean total BChE activity and mean MMSE scores between rivastigmine-treated and no-rivastigmine treated patients in CDR1 and CDR3 groups. However, in CDR2 group, the mean of total BChE activity was significantly lower in rivastigmine-treated patients (4.28 KU/L \pm 1.19) than no-rivastigmine treated patients (6.07 KU/L \pm 1.50; *t* = 3.98, *p* = 0.0003) (table 5) as the relative activities of all BChE molecular forms (table 6).

Table 5 - Means \pm Standard Deviations (S.D.) of MMSE and total BChE activity (ATV) in rivastigmine-treated patients (RVG) and no-rivastigmine treated patients (No-RVG) within each CDR group.

	CDR1 n = 48		CDR2 n = 47		CDR3 n = 41	
	ATV (KU/L)	MMSE	ATV (KU/L)	MMSE	ATV (KU/L)	MMSE
RVG	5.51 \pm 1.36	22.5 \pm 4.97	4.28 \pm 1.19	15.71 \pm 3.89	4.65 \pm 1.88	5.75 \pm 5.59
No-RVG	6.00 \pm 1.41	20.92 \pm 4.82	6.07 \pm 1.50	14.85 \pm 6.28	5.39 \pm 1.39	5.18 \pm 5.24
<i>p</i> (<i>t</i>-test)	0.3352	0.3650	0.0003	0.6356	0.1768	0.7625

Table 6 - Means \pm Standard Deviations (S.D.) of relative activity of the BChE bands (G4, G2, G1-ALB AND G1) in rivastigmine-treated patients (RVG) and no-rivastigmine treated patients (No-RVG) within CDR2 group. All BChE bands activity are presented in KU/L.

	CDR2 n = 47		
	RVG n = 14	No-RVG n = 33	p (t-test)
G4	2.82 \pm 0.88	3.55 \pm 1.01	0.0235
G2	0.46 \pm 0.27	0.86 \pm 0.38	0.0009
G1- ALB	0.46 \pm 0.21	0.84 \pm 0.43	0.0023
G1	0.55 \pm 0.28	0.83 \pm 0.43	0.0323

Since mean total BChE activity was different among CDRs groups and between rivastigmine-treated and no-rivastigmine treated patients, a multiple regression analysis was conducted considering CDR, sex and rivastigmine treatment as independent variables and total BChE activity as the dependent variable. This analysis confirmed that CDR acts as independent factor in the decrease of total plasma BChE activity ($\beta = 0.21 \pm 0.09$, $p = 0.0259$). Considering G4 and G1 as dependent variables, similar results were obtained.

4. DISCUSSION

BChE has been considered an enzyme without biological function even though it is widely distributed in tissues like blood, liver, heart and brain. However, the discovery of the BChE's ability to hydrolyze acetylcholine (ACh) and to act in the maintenance of the structural and functional integrity of central cholinergic pathways changed this view. According to Johnson and Moore (2012), BChE appears to be a good example of a gene that has survived by subfunctionalization.

It is noteworthy that BChE is found in the central and peripheral nervous system and it is the major ACh hydrolyzing enzyme in plasma (Lampón *et al.*, 2012) which is virtually free of AChE (Brimijoin; Hammond, 1988). BChE levels in the body exceed those of AChE in all tissues except muscle and brain (Li *et al.*, 2000). The human body contains ten times more molecules of BChE than AChE (Manoharan *et al.*, 2007). In the Alzheimer's disease, acetylcholinesterase is lost up to 85% in specific brain regions, whereas butyrylcholinesterase levels, chiefly the G1 form, rise with disease progression (Perry *et al.*, 1978; Arendt *et al.*, 1992).

Our results showed that there is a reduction in total plasma BChE activity in AD patients when compared to elderly controls (table 2). Furthermore, we also found that there is a reduction in the total plasma BChE activity with the AD progression as well as in the MMSE scores in AD patients. The decrease in total BChE activity was particularly significant between mild (CDR1) and severe AD stage (CDR3) patients groups (table 3). Interestingly, the regression analyzes results showed that AD is the main factor that influences the BChE activity in the case-control study, and the stage of disease (CDR) is the main factor that acts further reducing the plasma activity of this enzyme amongst patients. This fact highlights that the Alzheimer's disease is the first element that alters the homeostasis of the peripheral BChE activity while the evolution of the disease is the second one that exacerbates this decline in patients.

These results may be explained by BChE kinetic response to concentrations of ACh. It is known that BChE is less efficient in ACh hydrolysis at low concentrations but highly efficient at higher ones, situation in which AChE becomes substrate inhibited (Silver, 1974). Considering that AD is characterized by a cholinergic neuron loss and a progressive decline in acetylcholine (ACh) levels, the peripheral higher BChE activity becomes unnecessary in this condition, remaining at lower levels by a feedback mechanism. This hypothesis is supported by the fact that the activity of this enzyme is reduced peripherally with disease progression while high levels are progressively found in the brain with AD. According to Giacobini et al. (2002), the absolute levels of BChE activity in plasma and CSF (cerebrospinal fluid) were not significantly associated. This suggests that the BChE activity and its changes measured in CSF of AD patients does not have its origin from plasma, but most likely from the brain, presumably as a consequence of the higher BChE activity found in the brain of AD patients.

Additionally, we found that the decrease in the activity of BChE in patients was not homogeneously distributed to all molecular forms. We observed a significant reduction in G4, G1 and G1-ALB relative activities, but this did not occur with G2 band (table 2). Similarly, we found that this reduction was also not homogeneous when considering disease progression in patients. In this case, there were no significant reductions in relative activity of G2 and G1-ALB between CDR1 and CDR3 patients groups (table 3). These results differ from those of Boberg et al. (2010) and Silva et al. (2012) who reported homogeneous reduction of all molecular forms, in a

case-control study with obese and in a physical exercise intervention study with obese adolescents, respectively. Considering the different results found in the present study, it is possible that AD interferes in the regulation of proportionality between the relative activities of BChE molecular forms, which may further affect the role of this enzyme in the peripheral cholinergic system in AD progression.

Whereby BChE activity appears to be involved in the transformation of A β plaques from a benign diffuse state to the compact malignant form (Guillozet et al., 1997), non-selective inhibition may therefore help to slow down the formation of these plaques in AD patients brain (Giacobini, 2000). Evidence suggests that inhibition of both AChE and BChE by rivastigmine may be beneficial in treating the cognitive decline of AD (Giacobini et al., 2002) and might have the potential to provide the greatest long-term benefits (Darreh-Shori; Soininen, 2010).

Activities of AChE in CSF and of BChE in plasma and CSF are strongly inhibited by rivastigmine since that the inhibition of BChE in CSF is strong and consistently associated with improved cognitive performance (Giacobini et al., 2002). We found that patients treated with rivastigmine have total BChE and G4, G2 and G1-ALB activities significantly lower compared with patients not treated with this inhibitor (table 4), confirming the action of this drug on the plasma BChE activity. Similarly, Darreh-Shori et al. (2002) study, verified that rivastigmine causes persistent inhibition of AChE and BChE in CSF (by 36% for AChE and 45% for BChE) as well as plasma (27% for AChE and 33% for BChE) in eleven patients with mild AD.

We found significant reduction in plasma BChE activity in CDR2 group rivastigmine treated patients when compared with no-rivastigmine treated ones (table 5). Similar results occurred with the relative activity of all the molecular forms of BChE in CDR2 group (table 6). These findings suggest that a stronger rivastigmine effect is observed in patients with moderate AD than in mild and severe stages patients. The peripheral BChE inhibition was not correlated with changes of performance in speed/attention- and memory-related tasks (Giacobini et al., 2002) but the common side effects (nausea, gastrointestinal upset, and diarrhea) observed due to ChEIs acting in the peripheral nervous system are most notable for rivastigmine (Bullock et al., 2006; Casey et al., 2010). Then, our results show that the side effects may be intensified in CDR2 patients group just because the rivastigmine peripheral action seems to be more intense than in CDR1 and CDR3 groups. The

reduction in BChE activity observed in the moderate phase is a relevant clinical data, whereas the cholinergic signaling is involved in peripheral homeostasis through activation of the parasympathetic system and mediating both neuromuscular and inflammatory responses (Ofek; Soreq, 2013).

The BChE-K (K variant) is characterized by the substitution A539T in the tetramerization domain of the enzyme. Primarily, it was associated with 33% reduction of BChE molecules in plasma (Rubinstein et al., 1978) and with a 30% decreased capacity of hydrolyzing butyrylthiocholine (Bartels et al., 1992). However, Altamirano et al. (2000) reported that BChE-K demonstrates no apparent differences from wild-type BChE and this mutation does not affect hydrolytic activity neither tetramers formation. According to Podoly et al. (2009) BChE-K is inherently unstable and shows impaired quaternary organization when compared with the wild-type, resulting in reduced hydrolytic activity and predicting prolonged acetylcholine maintenance and protection from AD. However, other findings demonstrated that K variant was considerably less effective in attenuating the accumulation of A β fibrils than BChE wild-type (Diamant et al., 2006). Thus, this variant may pose either a risk or a protective factor in AD (Podoly et al., 2009). This study found no association between the K variant and AD, similar to the study of Simão-Silva et al. (2013) in a southeastern Brazilian population. The debate of the BChE function on AD neuropathology was accompanied by several studies that aimed to verify association between BChE-K and Alzheimer's disease. Some of them found the *BCHE-K* associated with AD (Raygani et al., 2004; McIlroy et al., 2000; Tilley et al., 1999; Wiebusch et al., 1999; Lehmann et al., 1997) and other found no association (Alvarez-Arcaya et al., 2000; Ki et al., 1999, Singleton et al., 1998). Different from Podoly et al. (2009), in the present study it was verified that the K variant acts by reducing G2, G1 and G1-ALB relative activities and not the tetramer (G4), which suffered greater influence of AD itself.

In conclusion, we demonstrated that there is lower total plasma BChE activity in AD patients than in elderly controls and that the reduction on plasma BChE activity is associated directly with AD progression. Thus, this work evidence that AD acts as a main factor in lowering plasma BChE activity and that severe stages are related with an even greater reduction. Another finding that caught our attention was the fact that rivastigmine showed a stronger effect in reducing peripheral BChE activity in

patients with moderate AD, which are, therefore, more likely to suffer anticholinergic side effects. Furthermore, we observed that the reduction of relative activity of BChE molecular forms were not homogeneous. The failure to maintain proportionality between molecular forms of BChE in AD may suggest that the disease interferes in the homeostasis regulation and may further affect the role of this enzyme in the peripheral cholinergic system. We understand that plasma BChE activity may be used as a secondary marker in AD and that the periodic cholinesterase peripheral activity evaluation may be contributing for AD progression evaluation, even as a pharmacological assessment tool in order to prevent side effects.

REFERENCES

- Altamirano, C.V., Bartels, C.F., Lockridge, O., 2000. The butyrylcholinesterase K-variant shows similar cellular protein turnover and quaternary interaction to the wild type enzyme. *J. Neurochem.* 74, 869-877.
- Alvarez-Arcaya, A., Combarros, O., Llorca, J. et al., 2000. The butyrylcholinesterase K variant is a protective factor for sporadic Alzheimer's disease in women. *Acta Neurol. Scand.* 102, 350–353.
- Arendt, T., Bruckner, M., Lange, M., Vigl, V., 1992. Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development – a study of molecular forms. *Neurochem. Int.* 21, 381–396.
- Arpagaus, M., Kott, M., Vatsis, K.P., Bartels, C.F., La Du, B.N., Lockridge, O., 1990. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry.* 29, 24-13.
- Bartels, C.F., Jensen, F.S., Lockridge, O. et al., 1992. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *Am. J. Hum. Genet.* 50, 1086–1103.
- Boberg, D., Furtado-Alle, L., Souza, R.L.R., Chautard-Freire-Maia, E.A., 2010. Molecular forms of butyrylcholinesterase and obesity. *Genet. Mol. Biol.* 33, 452-454.
- Brimijoin, S., Hammond, P., 1988. Butyrylcholinesterase in human brain and acetylcholinesterase in human plasma: trace enzymes measured by two-site immunoassay. *J. Neurochem.* 51, 1227–1231.
- Bullock, R.; Bergman, H.; Touchon, J. et al., 2006. Effect of age on response to rivastigmine or donepezil in patients with Alzheimer's disease. *Curr. Med. Res. Opin.* 22, 483-494.

Casey, D.A.; Antimisiaris, D.; O'Brien, J., 2010. Drugs for Alzheimer's Disease: Are They Effective? *P&T*. 35, 208-211.

Chautard-Freire-Maia, E.A., Primo-Parmo, S.L., Picheth, G. et al., 1991. C5 isozyme of serum cholinesterase and adult weight. *Hum. Hered.* 41, 330-339.

Clump Sham, P.C., Curtis, D., 1995. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Ann. Hum. Genet.* 59, 97-105.

Darreh-Shori, T.; Almkvist, O.; Guan, Z.Z. et al., 2002. Sustained cholinesterase inhibition in AD patients receiving rivastigmine for 12 months. *Neurology*. 59, 563-572.

Darreh-Shori, T.; Soininen, H., 2010. Effects of Cholinesterase Inhibitors on the activities and protein levels of cholinesterases in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease: a review of recent clinical studies. *Current Alzheimer Research*. 7, 67-73.

Darvesh, S., Cash, M.K., Reid, G.A., Martin, E., Mitnitski, A., Geula, C., 2011. Butyrylcholinesterase is associated with β -amyloid plaques in the transgenic APPSWE/PSEN1dE9 mouse model of Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 71, 2-14.

Davies, P.; Maloney, A.J., 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*. 2, 1403.

Diamant, S., Podoly, E., Friedler, A., Ligumsky, H., Livnah, O., Soreq, H., 2006. Butyrylcholinesterase attenuates amyloid fibril formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 8628–8633.

Dietz, A.A., Rubinstein, H.M., Lubrano, T. et al., 1972. Improved method for the differentiation of cholinesterase variants. *Am. J. Genet.* 24, 58-64.

Evans, R.T., Wroe, J., 1978. Is serum cholinesterase activity a predictor of succinyl choline sensitivity? An assessment of four methods. *Clin. Chem.* 24, 1762-1766.

Ferris, S., Karantzoulis, S., Somogyi, M., Meng, X., 2013. Rivastigmine in moderately severe-to-severe Alzheimer's disease: Severe Impairment Battery factor analysis. *Alzheimer's Research & Therapy*. 5, 63.

Giacobini, E., 2000. Cholinesterase inhibitors: from the calabar bean to Alzheimer therapy. In: Giacobini E (ed) *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors*. Martin Dunitz, London, 181–226. LIVRO

Giacobini, E.; Spiegel, R.; Enz, A. et al., 2002. Inhibition of acetyl- and butyrylcholinesterase in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease by rivastigmine: correlation with cognitive benefit. *J. Neural Transm.* 109, 1053-1065.

Gómez-Ramos, P., Morán, M.A., 1997. Ultrastructural localization of butyrylcholinesterase in senile plaques in the brains of aged and Alzheimer disease patients. *Mol.Chem.Neuropathol.* 30, 161–173.

Guillozet, A.L., Smiley, J.F., Mash, D.C., Mesulam, M.M., 1997. Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques. *Ann. Neurol.* 42, 909–918.

Harris, H., Hopkinson, D.A., Robson, E.B., 1962. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. *Nature.* 196, 1296-1298.

Hughes, C.P., Berg, L., Danziger, W.L. et al., 1982. A new clinical scale for the staging of dementia. *Br. J. Psychiatry.* 140, 566-572.

Jann, M.W., Shirley, K.L.; Small, G.W., 2002. 'Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of cholinesterase inhibitors', *Clin. Pharmacokinet.* 41, 719–739.

Johnson, G.; Moore, S.W., 2012. Why has butyrylcholinesterase been retained? Structural and functional diversification in a duplicated gene. *Neurochemistry International.* 61, 783-797.

Ki, C.S., Na, D.L., Kim, J.W. et al., 1999. No association between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in lateonset Alzheimer's disease. *Am. J. Med. Genet.* 88, 113–135.

Ladner, C.J.; Lee, J.M., 1998. Pharmacological treatment of Alzheimer disease: The cholinergic hypothesis revisited. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 719-731.

Lahiri, D.K., Nurnberger, Jr. J. L., 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 19, 5444.

Lampón, N., Hermida-Cadahia, E.F., Riveiro, A., Tutor, J.C., 2012. Association between butyrylcholinesterase activity and low-grade systemic inflammation. *Ann. Hepatol.* 11, 356–363.

Lehmann, D.J., Johnston, C., Smith, A.D., 1997. Synergy between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1933–1936.

Li, H., Schopfer, L.M., Masson, P. et al., 2008. Lamellipodin proline rich peptides associated with native plasma butyrylcholinesterase tetramers. *Biochem. J.* 411, 425-432.

Li, B., Stribley, J.A., Ticu, A. et al., 2000. Abundant Tissue Butyrylcholinesterase and Its Possible Function in the Acetylcholinesterase Knockout Mouse. *J. Neurochem.* 75, 1320–1331.

Manoharan, I., Boopathy, R., Darvesh, S., Lockridge, O., 2007. A medial health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in Vysya community of India. *Clin. Chim. Acta.* 378, 128-135.

- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H. et al., 2011. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging and Alzheimer's Association workgroup. *Alzheimer's & Dementia*. 7, 263–269.
- McIlroy, S.P., Crawford, V.L., Dynan, K.B. et al., 2000. Butyrylcholinesterase K variant is genetically associated with late onset Alzheimer's disease in Northern Ireland. *J. Med. Genet.* 37, 182–185.
- Masson, P., 1979. Formes moléculaires multiples de la butyrylcholinesterase du plasma humain. *Biochim. Biophys. Acta*. 578, 493-504.
- Michaelis, M.L., 2003. Drugs targeting Alzheimer's disease: some things old and some things new. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304, 897-904.
- Morris, J., 1993. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology*. 43, 2412-2414.
- Ofek, K., Soreq, H., 2013. Cholinergic involvement and manipulation approaches in multiple system disorders. *Chemico-Biological Interactions*. 203, 113–119.
- Perry, E., McKeith, I., Ballard, C., 2003. Butyrylcholinesterase and progression of cognitive deficits in dementia with Lewy bodies. *Neurol.* 60, 1852-1853.
- Perry, E.K., Perry, R.H., Blessed, G., Tomlinson, B.E., 1978. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of alzheimer type. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 4, 273–277.
- Podoly, E., Hanin, G., Soreq, H., 2010. Alanine-to-threonine substitutions and amyloid diseases: Butyrylcholinesterase as a case study. *Chem. Biol. Interact.* 187, 64-71.
- Podoly, E., Shalev, D.E., Shenhar-Tsarfaty, S. et al., 2009. The butyrylcholinesterase K variant confers structurally derived risks for Alzheimer pathology. *J. Biol. Chem.* 284,17170–17179.
- Pohanka, M., 2011. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 155, 219-230.
- Qaseem, A.; Snow, V.; Cross, J.T.Jr., 2008. Current Pharmacologic Treatment of Dementia: A clinical practice guideline from the american college of physicians and the American Academy of Family Physicians. *Ann Intern Med.* 148, 370-378.
- Raygani, A.V., Zahrai, M., Soltanzadeh, A. et al., 2004. Analysis of association between Butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E genotypes in Alzheimer's Disease. *Neurosc. Lett.* 371, 142–146.
- Roberson, M.; Harrell, L.E., 1997. Cholinergic activity and amyloid precursor protein metabolism. *Brain Res. Re.* 25, 50–69.

Rubinstein, H.M., Dietz, A.A., Lubrano, T., 1978. Ek1 another quantitative variant at cholinesterase locus 1. *J. Med. Genet.* 15, 27–29.

Silva, I.M.W., Leite, N., Boberg, D. et al., 2012. Effects of physical exercise on butyrylcholinesterase in obese adolescents. *Genetics and Molecular Biology.* 35, 4.

Silver, A., 1974. *The Biology of Cholinesterases.* Elsevier Agricultural Research Council Institute, New York, 426–447.

Simão-Silva, D.P., Bertolucci, P.H., Labio, R.W. et al., 2013. Association analysis between K and –116A variants of butyrylcholinesterase and Alzheimer's disease in a Brazilian population. *Chemico-Biological Interactions.*, 203, 358-360.

Singleton, A.B., Smith, G., Gibson, A.M. et al., 1998. No association between the K variant of the butyrylcholinesterase gene and pathologically confirmed Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 7, 937–939.

Souza, R.L.R., Mikami, L.R., Maegawa, R.O.B., Chautard-Freire-Maia, E.A., 2005. Four new mutations in the BCHE gene of human butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. *Mol. Genet. Metab.* 84, 349–353.

Tilley, L., Morgan, K., Grainger, J. et al., 1999. Evaluation of polymorphisms in the presenilin- 1 gene and the butyrylcholinesterase gene as risk factors in sporadic Alzheimer's disease. *Eur. J. Hum. Genet.* 7, 659–663.

Van Ros, G., Vervoot, T., 1973. Frequencies of the “atypical” and C5 variants of serum cholinesterase in Zairians and Belgians. Detection of the C5 variant by agar gel electrophoresis with an acid buffer. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 53, 633-644

Wescos, W.C., Hunt, C.H., Riker, W.F. et al., 1947. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. *Am. J. Physiol.* 149, 549-551.

Wiebusch, H., Poirier, J., Sevigny, P., Schappert, K., 1999. Further evidence for a synergistic association between APOE ϵ 4 and BCHE-K in confirmed Alzheimer's disease. *Hum. Genet.* 104, 158–163.

6. DISCUSSÃO GERAL

Diversos estudos têm mostrado associação entre o aumento da atividade da BChE plasmática e a obesidade (IWASAKI *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2008), resistência à insulina e síndrome metabólica (SHENHAR-TSARFATY *et al.*, 2011; IWASAKI *et al.*, 2007; RANDELL *et al.*, 2005; VALLE *et al.*, 2006), hiperlipidemia (KÁLMÁN *et al.*, 2004), hipertensão (ALCÂNTARA *et al.*, 2002) e diabetes tipo 1 e tipo 2 (ABBOTT *et al.*, 1993; DAVE; KATYARE, 2000). Por outro lado, diminuição da atividade dessa enzima no plasma foi observada com pacientes com diabetes mellitus gestacional (GUIMARÃES *et al.*, 2014). Na doença de Alzheimer, há redução na atividade da acetilcolinesterase no cérebro, enquanto que, os níveis de BChE aumentam com a progressão da doença (PERRY *et al.*, 1978; ARENDT *et al.*, 1992). Poucos estudos têm avaliado essa enzima no plasma de pacientes com DA.

A butirilcolinesterase é a principal colinesterase envolvida na hidrólise da acetilcolina plasmática (LAMPÓN *et al.*, 2012), sendo considerada secundária na hidrólise desse neurotransmissor no sistema nervoso central. O presente trabalho verificou que a atividade da butirilcolinesterase plasmática está reduzida em pacientes com a doença de Alzheimer quando comparado com os controles. No grupo de pacientes, foi observado que, a atividade da BChE diminui com a progressão da doença, sendo significativamente menor no grupo de pacientes com CDR3 em relação àqueles com CDR1. No estudo caso-controle, a análise de regressão mostrou que a doença de Alzheimer é o principal fator que influencia na atividade da BChE, ao passo que o sexo, o fenótipo do loco *CHE2* e o tratamento com rivastigmina são variáveis que não influenciaram significativamente na redução da atividade dessa enzima nos pacientes. Foi verificado que a variante K também atua nessa diminuição, embora a frequência dessa variante tenha sido semelhante em casos e controles. A análise de regressão feita no estudo com os pacientes evidenciou que o grau de demência (CDR) é o principal fator que atua reduzindo ainda mais a atividade dessa enzima no plasma de pacientes com DA. Este fato indica que a doença de Alzheimer altera a atividade da BChE periférica enquanto que a progressão da doença atua reduzindo ainda mais a atividade dessa enzima nos pacientes com DA.

Esses resultados podem ser explicados pela resposta da BChE aos níveis de acetilcolina, já que essa enzima é pouco eficiente em baixas concentrações de ACh, tendo sua atividade hidrolítica potencializada quando há altos níveis desse neurotransmissor, situação em que a atividade da AChE torna-se drasticamente reduzida (SILVER, 1974). Considerando que na DA há um prejuízo do sistema colinérgico, tanto periférico como central, a atividade plasmática da BChE tende a estar reduzida em resposta ao déficit de acetilcolina periférica. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que a atividade plasmática dessa enzima reduz ainda mais com a progressão da doença. Por outro lado, no cérebro com DA, a atividade da BChE aumenta com a progressão da doença afim de compensar a deficiência na hidrólise central de acetilcolina (DUYSEN *et al.*, 2007; MESULAM *et al.*, 2002; LAYER *et al.*, 1992), sendo que essa alteração não tem relação com os níveis plasmáticos, mas presumidamente com a demanda central exigida nessa condição (GIACOBINI *et al.*, 2002).

Também foi encontrado que, a redução na atividade da BChE não ocorreu de forma homogênea em todas as formas moleculares da BChE, pois no dímero não foi encontrada diferença significativa na atividade entre pacientes e controles, e entre os grupos de pacientes com CDR1 e CDR3, o dímero e o monômero ligado à albumina também não demonstraram diferença significativa. Esses resultados diferem do que foi encontrado nos estudos de Boberg *et al.* (2010) e Silva *et al.* (2013), os quais verificaram redução proporcional na atividade de todas as formas moleculares da BChE em um estudo caso-controle com obesos e outro com intervenção com exercícios físicos programados em adolescentes obesos, respectivamente. Estes autores sugerem que a proporção entre as formas moleculares é regulada e importante para a função da BChE. No presente estudo, os resultados sugerem que a doença de Alzheimer interfere na regulação da proporcionalidade entre as atividades relativas das formas moleculares da butilcolinesterase, o que pode afetar ainda mais o papel dessa enzima no sistema colinérgico periférico.

A associação entre os níveis séricos de BChE e a inflamação demonstraram que a atividade dessa enzima diminui com o grau de inflamação subclínica (LAMPÓN *et al.*, 2012), sugerindo que o aumento na atividade plasmática e/ou tecidual da BChE descrito em várias condições clínicas como diabetes poderia servir

como um marcador de inflamação sistêmica de baixo grau (DAS, 2007; RAO *et al.*, 2007). Porém, diferente do exposto por Lampón *et al.* (2012), não foi encontrada relação entre a atividade plasmática da BChE e a inflamação sistêmica de baixo grau decorrente da DA, já que os pacientes apresentaram menor atividade da enzima quando comparado com os controles.

O tratamento sintomático da DA envolve o uso de inibidores das colinesterases que podem ser seletivos para a AChE (donepezil e galantamina) ou de dupla inibição (rivastigmina), inibindo tanto a AChE quanto a BChE. Estudos sugerem que a inibição de ambas as colinesterases pode trazer benefícios no tratamento do declínio cognitivo e atrasar a formação da placa A β maligna (GIACOBINI, 2000; GIACOBINI *et al.*, 2002). Estudo de Darreh-Shori *et al.* (2002) verificou que o tratamento com rivastigmina causa inibição persistente da AChE e da BChE no líquido e no plasma de pacientes com DA leve. De modo similar, no presente estudo também foi verificado que os pacientes tratados com rivastigmina apresentaram atividade total da BChE e de G2 e G1-ALB significativamente menores do que os pacientes não tratados com esse inibidor, confirmando a ação desse fármaco sobre a atividade da BChE plasmática.

Quando analisado o efeito do tratamento com a rivastigmina entre os grupos de CDR, foi encontrado que há uma redução significativa na atividade plasmática da BChE assim como de todas as formas moleculares no grupo de pacientes com CDR2. Esse achado sugere que a rivastigmina possui maior efeito em pacientes com DA moderada do que naqueles com DA leve ou grave. A inibição periférica da BChE não está relacionada com alteração no desempenho no CNTB (*Computerised Neuropsychological Test Battery*) (GIACOBINI *et al.*, 2002), mas os efeitos colaterais comumente observados devido a ação dos IChEs no sistema nervoso periférico (náusea, diarreia e desconforto gastrointestinal) são mais notáveis com o uso de rivastigmina (BULLOCK *et al.*, 2006; CASEY *et al.*, 2010). Dessa forma, os resultados desse estudo indicam que esses efeitos indesejáveis podem ser intensificados nos pacientes com DA moderada em tratamento com a rivastigmina.

Não foi observada associação entre a variante K do gene *BCHE* e a DA, assim como no estudo de Simão-Silva *et al.* (2013) em população do sudeste do Brasil. De acordo com Podoly *et al.* (2009), a BChE-K possui atividade diminuída em relação a BChE usual, pois é instável e apresenta organização da estrutura

quaternária comprometida. No entanto, os resultados do presente trabalho, mostram que, o comprometimento da atividade hidrolítica da BChE-K pode ser observado nas formas G1, G1-ALB e G2, sendo que no tetrâmero, a redução na atividade está fortemente associada com a presença da DA.

Este foi o primeiro trabalho que avaliou a atividade plasmática total da butirilcolinesterase e das formas moleculares (G1, G1-ALB, G2 e G4) em pacientes com doença de Alzheimer e em controles idosos levando em consideração fatores que sabidamente interferem na atividade dessa enzima como o gênero, o fenótipo do loco *CHE2*, a variante *K* do gene *BCHE* e o tratamento com rivastigmina. Os resultados obtidos no presente estudo colaboram para o melhor entendimento do que ocorre no sistema colinérgico periférico na DA e como a butirilcolinesterase é afetada e atua dentro desse sistema.

7. CONCLUSÕES

O estudo verificou que a atividade média total da BChE é significativamente menor nos pacientes com DA em relação aos controles, sendo que essa redução não ocorre de forma proporcional em todas as formas moleculares da enzima. No grupo de pacientes com doença de Alzheimer, foi possível observar que há redução na atividade da butirilcolinesterase com a progressão da doença, assim como das formas moleculares G4 e G1. Este resultado indica que a DA interfere na regulação da proporcionalidade das formas moleculares da BChE e também que, em resposta ao déficit colinérgico periférico, a atividade da BChE tende a permanecer reduzida no plasma de pacientes com DA.

O tratamento com rivastigmina reduz significativamente a atividade total da BChE plasmática e das formas moleculares em pacientes com DA moderada, sugerindo que este grupo de pacientes está mais sujeito aos efeitos colaterais decorrentes da inibição periférica da BChE.

A frequência do fenótipo *CHE2* C5+, previamente associado com atividade aumentada da BChE plasmática, não diferiu significativamente entre pacientes e controles. Considerando a baixa frequência desse fenótipo na população (aproximadamente 10%), um estudo com maior número de indivíduos poderá esclarecer melhor o papel do loco *CHE2* na atividade da BChE em pacientes com DA. O estudo também não encontrou associação entre a variante K e a doença de Alzheimer, entretanto, foi verificado que a presença dessa variante reduz significativamente a atividade da BChE.

As análises de regressão confirmaram que a presença da DA é o principal fator envolvido na diminuição da atividade da plasmática da BChE, assim como a evolução da doença atua reduzindo ainda mais a atividade da enzima nos pacientes com DA. Esse resultado sugere que a atividade reduzida da butirilcolinesterase no plasma de pacientes com DA pode ser um potencial marcador secundário da progressão doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, C.A.; MACKNESS, M.I.; KUMAR, S. et al., Relationship between serum butyrylcholinesterase activity, hypertriglyceridaemia and insulin sensitivity in diabetes mellitus. **Clin. Sci. (Lond)**, v. 85, p. 77–81, 1993.
- AKIZUKI, S.; OHNISHI, A.; KOTANI, K.; SUDO, K. Genetic and immunological analyses of patients with increased serum butyrylcholinesterase activity and its C5 variant form. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 42, p. 991-996, 2004.
- ALCÂNTARA, V. M.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A.; PICHETH, G.; VIEIRA, M. M. A method for serum cholinesterase phenotyping. **Rev. Bras. Genet.**, v. 14, p. 841-846, 1991.
- ALCÂNTARA, V. M. **Fenótipos da butirilcolinesterases e suas relações com dados antropométricos, bioquímico-hormonal e pressão arterial em obesos na população de Curitiba, PR.** 230f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.
- ALCÂNTARA, V.M.; RODRIGUES, L.C.; OLIVEIRA, L.C.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Association of the CHE2 locus with body mass index and butyrylcholinesterase activity. **Hum Biol.**, v. 73, p. 587-595, 2001.
- ALCÂNTARA, V.M., CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A., SCARTEZINI, M. et al. Butyrylcholinesterase activity and risk factors for coronary artery disease. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 62, p. 399–404, 2002.
- ALCÂNTARA, V. M. et al. Butyrylcholinesterase activity and metabolic syndrome in obese patients. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 43 (3), p. 285-288, 2005.
- ALMEIDA, O. P.; SHIMOKOMAKI, C. M. Apolipoprotein E4 and Alzheimer's disease in São Paulo - Brazil. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, v. 55, n. 1, 1997 .
- ALTAMIRANO, C. V.; BARTELS, C. F.; LOCKRIDGE, O. The butyrylcholinesterase K-variant shows similar cellular protein turnover and quaternary interaction to the wild type enzyme. **J. Neurochem.**, v. 74, p. 869-877, 2000.
- APA, AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. DSM-V. **APA**, 2013. Disponível em file:///C:/Users/Gleyse/Downloads/changes-from-dsm-iv-tr--to-dsm-5.pdf. Acesso em 25/03/2014.
- ARENDT, T.; BRUCKNER, M.; LANGE, M.; VIGL, V. Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development – a study of molecular forms. **Neurochem. Int.**, v. 21, p. 381–396, 1992.
- ARPAGAU, M.; KOTT, M.; VATSIS, K. P.; BARTELS, C. F.; LA DU, B. N.; LOCKRIDGE, O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. **Biochemistry**, v. 29, p. 124-131, 1990.
- ATALAIA-SILVA, K. C.; RIBEIRO, P. C. C.; LOURENÇO, R. A. **Epidemiologia das demências.** Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ, Rio de Janeiro, ano 7, p. 46-51, jan/jun. 2008.
- BALASUBRAMANIAN, A. S.; BHANUMATHY, C. D. Noncholinergic functions of cholinesterases. **FASEB J.**, v. 7, p. 1354-58, 1993.
- BARTELS, C. F.; VAN DER SPEK, A. F. L.; LA DU, B. N. Two polymorphisms in the noncoding regions of the BCHE gene. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, p. 6171, 1990.

BARTELS, C. F.; JENSEN, F. S.; LOCKRIDGE, O. et al. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 50, p. 1086-103, 1992.

BARTORELLI, L.; GIRALDI, C.; SACCARDO, M.; CAMMARATA, S.; BOTTINI, G.; FASANARO, A.M.; TREQUATTRINI, A. Effects of switching from an AChE inhibitor to a dual AChE-BuChE inhibitor in patients with Alzheimer's disease. **Curr. Med. Res. Opin.**, v. 21, p. 1809–1818, 2005.

BERTOLUCCI, P. H., BRUCKI, S. M., CAMPACCI, S. R., JULIANO, Y. O mini-exame do estado mental em uma população geral: impacto da escolaridade. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 52, p. 1-7, 1994.

BERTRAM, L.; LILL, C. M.; TANZI, R. E. The genetics of Alzheimer disease: back to the future. **Neuron**, v. 68, p. 270–281, 2010.

BETTENS, K.; SLEEGERS, K.; VAN BROECKHOVEN, C. Genetic insights in Alzheimer's disease. **Lancet Neurol.**, v. 12, p. 92-104, 2013.

BIZZARRO, A.; GUGLIELMI, V.; LOMASTRO, R.; VALENZA, A.; LAURIA, A.; MARRA, C.; SILVERI, M. C.; TIZIANO, F. D.; BRAHE, C.; MASULLO, C. BChE K variant is decreased in Alzheimer's disease not in fronto-temporal dementia. **J. Neural Transm.**, v. 117, p. 377-383, 2010.

BLACK, S. E.; DOODY, R.; LI, H. et al. Donepezil preserves cognition and global function in patients with severe Alzheimer disease. **Neurology**, v. 69, p. 459-469, 2007.

BLESA, R.; BULLOCK, R.; HE, Y.; BERGMAN, H.; GAMBINA, G.; MEYER, J. et al. Effect of butyrylcholinesterase genotype on the response to rivastigmine or donepezil in younger patients with Alzheimer's disease. **Pharmacogenet. Genom.**, v. 16, p. 771–774, 2006.

BOBERG, D. R. et al. Molecular forms of butyrylcholinesterase and obesity. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33 (3), p. 452-454, 2010.

BOTTINO, C. M.; AZEVEDO, D. Jr.; TATSCH, M.; HOTOTIAN, S.R.; MOSCOSO, M. A.; FOLQUITTO, J.; SCALCO, A. Z.; BAZZARELLA, M. C.; LOPES, M. A.; LITVOC, J. Estimate of dementia prevalence in a community sample from São Paulo, Brazil. **Dement. Geriatr. Cogn. Disord.**, v. 26 (4), p. 291-299, 2008.

BRUCKI, S. M. D.; MAGALDI, R. M.; MORILLO, L. S.; CARVALHO, I.; PERROCO, T. R.; BOTTINO, C. M. de C.; FILHO, W. J.; NITRINI, R. **Demências - Enfoque Multidisciplinar: das bases fisiopatológicas ao diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Atheneu, 2011.

BULLOCK, R.; BERGMAN, H.; TOUCHON, J. GAMBINA, G.; HE, Y.; NAGEL, J. LANE, R. Effect of age on response to rivastigmine or donepezil in patients with Alzheimer's disease. **Curr. Med. Res. Opin.**, v. 22, p. 483-494, 2006.

BURNS, A.; BERNABEI, R. B.; JENTOFT, A. J. C. et al. Safety and efficacy of galantamine (Reminyl) in severe Alzheimer's disease (the SERAD study): a randomised, placebo-controlled, double-blind trial. **Lancet Neurol.**, v. 8, p. 39-47, 2009.

CAÇÃO, J. de C.; SOUZA, D. R. S.; TOGNOLA, W. A., GODOY, M. R. P.; PINHEL, M. A. de S. Polimorfismo da apolipoproteína e nos familiares em primeiro grau de pacientes com doença de Alzheimer familiar ou esporádica. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, v. 65 (2A), p. 295-298, 2007.

CAMPION, D.; DUMANCHIN, C.; HANNEQUIN D. et al. Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. **Am. J. Hum. Genet.**, v.65, p. 664-670, 1999.

CARAMELLI, P.; BARBOSA, M.T. Como diagnosticar as quatro causas mais frequentes de demência? **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 24, p. 7-10, 2002.

CARAMELLI, P.; CHAVES, M. L. F., ENGELHARDT, E. *et al.* Effects of Galantamine on attention and memory in Alzheimer's disease measured by computerized neuropsychological tests. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 62 (2-B), p. 379-384, 2004.

CASEY, D.A.; DEMETRA, A.; O'BRIEN, J. Drugs for Alzheimer's Disease: Are They Effective?. **P&T.**, v.35, p. 208-211, 2010.

CERBAI, F.; GIOVANNINI, M.G.; MELANI, C.; ENZ, A. PEPEU, G. N1phenethyl-norcymserine, a selective butyrylcholinesterase inhibitor, increases acetylcholine release in rat cerebral cortex: A comparison with donepezil and rivastigmine. **European Journal of Pharmacology**, v. 572, p. 142–150, 2007.

CHATTONET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparision of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **Biochem. J.**, v. 260, p. 625-34, 1989.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A.; PRIMO-PARMO, S. L.; PICHETH, G.; LOURENÇO, M. A. C.; VIEIRA, M. M. The C5 isozyme of serum cholinesterase and adult weight. **Hum. Hered.**, v. 41, p. 330-339, 1991.

COON, K. D.; MYERS, A. J.; CRAIG, D. W.; WEBSTER, J. A.; PEARSON, J. V.; LINCE, D. H.; ZISMANN, V. L.; BEACH, T. G.; LEUNG, D.; BRYDEN, L. *et al.* A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease. **J. Clin. Psychiatry**, v. 68, p. 613–618, 2007.

CRUCHAGA, C.; KARCH, C.M.; JIN, S.C. *et al.* Rare coding variants in the phospholipase D3 gene confer risk for Alzheimer's disease. **Nature**, v. 505, p. 550-554, 2013.

DARREH-SHORI, T.; ALMKVIST, O.; GUAN, Z.Z. *et al.* Sustained cholinesterase inhibition in AD patients receiving rivastigmine for 12 months. **Neurology**, v. 59, p. 563- 572, 2002.

DARVESH, S.; HOPKINS, D.A. Differential distribution of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase in the human thalamus. **J. Comp. Neurol.**, v.463, p. 25-43, 2003.

DARVESH, S.; HOPKINS, D.A.; GEULA, C. 'Neurobiology of butyrylcholinesterase', **Nat. Rev. Neurosci.**, vol. 4, p. 131–138, 2003.

DAS, H. K.; MCPHERSON, J.; BRUNS, G. A.; KARATHANASIS, S. K.; BRESLOW, J. L. Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. **J. Biol. Chem.**, v. 260, p.6240–6247, 1985.

DAS, U.N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. **Med. Sci. Monit.**, v. 13, p. 214-221, 2007.

DAVE, K.R., KATYARE, S.S. Effect of alloxan-induced diabetes on serum and cardiac butyrylcholinesterases in the rat. **J. Endocrinol.**, v. 175, p. 241–50, 2002.

DE FELICE, F.G.; VIEIRA, M.N.; SARAIVA, L.M.; GARCIA-ABREU, J.; CHANG, L.; LIU, R.; FIGUEROA-VILLAR, J.D.; KLEIN, W.L.; FERREIRA, S.T. Targeting the neurotoxic species in Alzheimer s disease: Inhibitors of Abeta oligomerization. **The FASEB J.**, v.18, p.1366-1372, 2004.

DE VRIESE, C.; GREGOIRE, F.; LEMA-KISOKA, R.; WAELBROECK, M.; ROBBERECHT, P.; DELPORTE, C. Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. **Endocrinology**, v. 145, p. 4997-5005, 2004.

DIAMANT, S.; PODOLY, E.; FRIEDLER, A.; LIGUMSKY, H.; LIVNAH, O.; SOREQ, H. Butyrylcholinesterase attenuates amyloid fibril formation in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 103, p. 8628–8633, 2006.

DIETZ, A. A.; RUBINSTEIN, H. M.; LUBRANO, T.; HODGES, L. K. Improved method for the differentiation of cholinesterase variants. **Am. J. Genet.**, v. 24, p. 58-64, 1972.

DUFF, K. Normal and abnormal tau neurobiology. **Alzheimer Dis. Assoc. Disord.**, v. 20 (4), p. 202-205, 2006.

DUYSEN, E.G.; LI, B.; DARVESH, S.; LOCKRIDGE, O. Sensitivity of butyrylcholinesterase knockout mice to (–)-huperzine A and donepezil suggests humans with butyrylcholinesterase deficiency may not tolerate these Alzheimer's disease drugs and indicates butyrylcholinesterase function in neurotransmission. **Toxicology**, v. 233, p. 60–69, 2007.

ENGELHARDT, E.; BRUCKI, S. M. T.; CAVALCANTI, J. L. S. *et al.* Treatment of Alzheimer's disease: recommendations and suggestions of the Scientific Department of Cognitive Neurology and Aging of the Brazilian Academy of Neurology. **Arq Neuropsiquiatr.**, v. 63, n. 4, p. 1104–1112, 2005.

ETCHEBERRIGARAY, R.; TAN, M.; DEWACHTER, I. *et al.* Therapeutic effects of PKC activators in Alzheimer's disease transgenic mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101 (30), p. 11141-11146, 2004.

EVANS, R. T.; WROE, J. Is serum cholinesterase activity a predictor of succinyl choline sensitivity? An assessment of four methods. **Clin. Chem.**, v. 24, p. 1762-1766, 1978.

FARRIMOND, L. E.; ROBERTS, E.; MCSHANE, R. Memantine and cholinesterase inhibitor combination therapy for Alzheimer's disease: a systematic review. **BMJ Open**, v. 2 (3), 2012.

FAZEKAS, F.; STRASSER-FUCHS, S.; KOLLEGER, H.; BERGER, T.; KRISTOFERITSCH, W.; SCHMIDT, H.; ENZINGER, C.; SCHIEFERMEIER, M.; SCHWARZ, C.; KORNEK, B. *et al.* Apolipoprotein E epsilon 4 is associated with rapid progression of multiple sclerosis. **Neurology**, v. 57, p. 853–857, 2001.

FLEISHER, A.S.; RAMAN, R. SIEMERS, E.R. *et al.* Phase II safety trial targeting amyloid beta production with a gamma-secretase inhibitor in Alzheimer's disease. **Arch. Neurol.**, v. 65 (8), p. 1031-1038, 2008.

FOLSTEIN, M.F., FOLSTEIN, S.E., MCHUGH, P.R. Mini-Mental State: a practical method for grading the cognitive state of patients for clinician. **J. Psychiatr. Res.**, v.12, p. 189-198.1975.

FORLENZA, O.V.; DINIZ, B.S.; GATTAZ, W.F. Diagnosis and biomarkers of predementia in Alzheimer's disease. **BMC Med.**, v.8. 2010.

FRANCIS, P.T.; PALMER, A.M.; SNAPE, M.; WILCOCK, G.K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 66, p. 137-147, 1999.

FROTA, N.A.F.; NITRINI, R.; DAMASCENO, B.P. *et al.* Critérios para o diagnóstico de doença de Alzheimer. **Dement. Neuropsychol.**, v.5,p. 5-10. 2011

FURTADO, L. **Variabilidade Genética da Butirilcolinesterase e Obesidade**. Curitiba, 2005. Tese de Doutorado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.

FURTADO-ALLE, L.; ANDRADE, F. A.; NUNES, K.; MIKAMI, L. R.; SOUZA, R.L.R.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Association of variants of the –116 site of the butyrylcholinesterase BCHE gene to enzyme activity and body mass index. **Chemico-Biol. Interactions**, v.175 p.115–118, 2008.

GARCIA-AYLLON, M.S.; SAEZ-VALERO, J.; MUNOZ-DELGADO, E.; VIDAL, C.J. Identification of hybrid cholinesterase forms consisting of acetyl- and butyrylcholinesterase subunits in human glioma. **Neuroscience**, v. 107, p. 199-208, 2001.

GATZ, M.; REYNOLDS, C.A.; FRATIGLIONI, L. *et al.* Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. **Arch. Gen. Psychiatry**, v.63, p.168–174, 2006.

GAUTHIER, S.; REISBERG, B.; ZAUDIG, M. *et al.* Mild cognitive impairment. **Lancet**, v. 367, p. 1262-1270, 2006.

GEORGE, S. T.; BALASUBRAMANIAN, A. The aryl acylamidase and their relationship to cholinesterase in human serum, erythrocyte and liver. **Eur. J. Biochem.**, v. 121, p. 177-186, 1981.

GIACOBINI, E.; SPIEGEL, R.; ENZ, A. *et al.* Inhibition of acetyl- and butyryl-cholinesterase in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease by rivastigmine: correlation with cognitive benefit. **J. Neural Transm.**, v. 109, p. 1053-1065, 2002.

GIACOBINI, E. Butyrylcholinesterase: Its structure and function. Taylor and Francis Group plc, 2003.

GIACOBINI, E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. **Pharmacological Research**, v. 50, p. 433-440, 2004.

GREIG, N. H.; UTSUKI, T.; INGRAM, D. K.; WANG, Y.; PEPEU, G.; SCALI, C.; YU, Q-S.; MAMCZARZ, J.; HOLLOWAY, H. W.; GIORDANO, T. *et al.* Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer amyloid peptide in rodent. **PNAS**, v. 102 (47), p.17213–17218, 2005.

GROSSBERG, G. T.; EDWARDS, K. R.; ZHAO, Q. Rationale for combination therapy with galantamine and memantine in Alzheimer's disease. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 46, p. 17S-26S, 2006.

GRUBBER, J. M.; SAUNDERS, A. M.; CRANE-GATHERUM, A. R. *et al.* A. Analysis of association between Alzheimer disease and the K variant of butyrylcholinesterase (BCHE-K). **Neurosci. Lett**, v. 269, p. 115-119, 1999.

GUERREIRO, R.; WOJTAS, A.; BRAS, J. *et al.* TREM2 Variants in Alzheimer's Disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 368, p. 117-127, 2013.

GUIMARÃES, L.O., ANDRADE, F., BONO, G.F. *et al.* Gestational diabetes mellitus (GDM) decreases butyrylcholinesterase (BChE) activity and changes its relationship with lipids. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, p. 1-6, 2014.

HALL, L.M.C.; SPIERER, P. The Ace locus of *Drosophila melanogaster*: structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5' leader. **EMBO J.**, v. 5, p. 2949-2954, 1986.

HARRIS, H.; HOPKINSON, D. A.; ROBSON, E. B. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. **Nature**, London, v. 196, p. 1296-1298, 1962.

HARRIS, H.; ROBSON, E. B.; GLEN-BOTT, A. M. e THORNTON, J. A. Evidence for non-allelism between genes affecting human serum cholinesterase. **Nature**, v. 200, p. 1185-87, 1963a.

HARRIS, H.; ROBSON, E. B.; HOPKINSON, D.A. e WHITTAKER, M. Genetical studies on a new variant of serum pseudocholinesterase detected by electrophoresis. **Ann. Hum. Genet.**, v. 26, p. 359-82, 1963b.

HARRIS, H. **The principles of human biochemical genetics**. 3^a ed. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical, 1980, p. 171.

HERRERA Jr, E.; CARAMELLI, P.; SILVEIRA, A. S. B.; NITRINI, R. Epidemiologic Survey of Dementia in a Community-Dwelling Brazilian Population. **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, v. 16 (2), p. 103-108, 2002.

HUANG, Y.; LIU, X. Q.; WYSS-CORAY, T.; BRECHT, W. J.; SANAN, D. A.; MAHLEY, R. W. Apolipoprotein E fragments present in Alzheimer's disease brains induce neurofibrillary tangle-like intracellular inclusions in neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 98, p. 8838–8843, 2001.

- HUANG, Y. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. **Neurology**, v. 66, p. S79-S85, 2006.
- HUGHES, C.P.; BERG, L.; DANZIGER, W.L.; COBEN, L.A.; MARTIN, R.L. A new clinical scale for the staging of dementia. **Br. J. Psychiatry**, v. 140, p. 566-572. 1982.
- HYMAN, B.T.; TROJANOWSKI, J.Q. Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer disease from the National Institute on Aging and the Reagan Institute Working Group on diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer disease. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v.56, p.1095-1097, 1997.
- ISIK, A. T.; YILDIZ, G. B.; BOZOGLU, E.; YAY, A.; AYDEMIR, E. Cardiac safety of donepezil in elderly patients with Alzheimer disease. **Intern. Med.**, v. 51, p. 575-578, 2012.
- IWASAKI, T., YONEDA, M., NAKAJIMA, N., TERAUCHI, Y. Serum butyrylcholinesterase is strongly associated with adiposity, the serum lipid profile and insulin resistance. **Intern. Med.**, v. 46, p. 1633–1639, 2007.
- IZZO, G.; FORLENZA, O.V.; SANTOS, B.dos. et al. Single-nucleotide polymorphisms of GSK3B, GAB2 and SORL1 in late-onset Alzheimer's disease: interactions with the APOE genotype. **Clinics**, v. 68, p. 277-280, 2013.
- JACK, C.R.Jr.; KNOPMAN, D.S.; JAGUST, W.J. *et al.* Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. **Lancet Neurol.**, v.9, p. 119-128, 2010.
- JAGANATHAN, L.; BOOPATHY, R. A direct method to visualize the aryl acylamidase activity on cholinesterases in polyacrylamide gels. **BMC Biochemistry**, v. 1, p. 3, 2000.
- JANN, M.W.; SHIRLEY, K.L.; SMALL, G.W. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cholinesterase Inhibitors. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 41, p. 719-739, 2002.
- JAYANTHI, L. D.; BALASUBRAMANIAN, N.; BALASUBRAMANIAN, A. S. Cholinesterases exhibiting aryl acylamidase activity in human amniotic fluid. **Clin. Chim. Acta.**, v. 205, p. 157-166, 1992.
- JBILLO, O.; TOUTANT, J.P.; VATSIS, K.P.; CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Promoter and Transcription Start Site of Human and Rabbit Butyrylcholinesterase Genes. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 33, p. 20829-20837, 1994.
- JOHNSON, G.; MOORE, S.W. Cholinesterases modulate cell adhesion in human neuroblastoma cells in vitro. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 18, p. 781–790, 2000.
- JONSSON, T.; ATWAL, J. K.; STEINBERG, S. *et al.* Amutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. **Nature**, v. 488, p. 96-99, 2012.
- JOPE, R. S.; YUSKAITIS, C. J.; BEUREL, E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. **Neurochem Res.**, v. 32 (4-5), p. 577-595, 2007.
- KÁLMÁN, J., JUHÁSZ, A., RAKONCZAY, Z. et al. Increased serum butyrylcholinesterase activity in type IIb hyperlipidaemic patients. **Life Sci.**, v. 75, p. 1195–1204, 2004.
- KALOW, W.; GENEST, K. A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase. Determination of dibucaine numbers. **Canad. J. Biochem. Physiol.**, v. 35, p. 339-346, 1957.
- KATZ, S., DOWNS, T.D., CASH, H.R., GROTZ, R.C. Progress in development of the index of ADL. **Gerontologist.**, v.10, p. 20-30. 1970.
- KNAPP, M.J.; KNOPMAN, D.S.; SOLOMON, P.R. et al. A 30-Week Randomized Controlled Trial of High-Dose Tacrine in Patients With Alzheimer's Disease. **JAMA**, v. 271, p. 985-991, 1994.

KNOPMAN, D.S.; DEKOSKY, S.T.; CUMMINGS, J.L.; CHANCE, J.M.; FILIS, S. Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurology**, v.56, p.1143-1153, 2001.

KRAUSE, M.; LESLIE, J. D.; STEWART, M.; LAFUENTE, E. M.; VALDERRAMA, F.; JAGANNATHAN, R.; STRASSER, G. A.; RUBINSON, D. A.; LIU, H.; WAY, M. Lamellipodin, an Ena/VASP ligand, is implicated in the regulation of lamellipodial dynamics. **Dev. Cell**, v. 7, p. 571–583, 2004.

KUMMER, W.; LIPS, K.S.; PFEIL, U. The epithelial cholinergic system of the airways. **Histochem Cell Biol.**, v. 130, p. 219-234, 2008.

KUTTY, K. M. Biological function of cholinesterase. **Clin. Biochem.**, v. 13, p. 239-43, 1980.

LAI, M. K.; TSANG, S. W.; GARCIA-ALLOZA, M.; MINGER, S. L.; NICOLL, J. A.; ESIRI, M. M.; WONG, P. T.; CHEN, C. P.; RAMIREZ, M. J.; FRANCIS, P. T. Selective effects of the APOE epsilon4 allele on presynaptic cholinergic markers in the neocortex of Alzheimer's disease. **Neurobiol. Dis.**, v. 22, p. 555–561, 2006.

LAM, B.; HOLLINGDRAKE, E.; KENNEDY, J.L. et al. Cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease and Lewy body spectrum disorders: The emerging pharmacogenetic story. **Human Genomics.**, v. 4, p. 91–106, 2009.

LAPIDOT-LIFSON, Y.; PRODY, C. A.; GINZBERG, D.; MEYTES, D.; ZAKUT, H.; SOREQ, H. Co-amplification of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes in blood cells: correlation with various leukemias and abnormal megakaryocytopoiesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 4715-4717, 1989.

LAMPÓN, N.; HERMIDA-CADAHIA, E.F.; RIVEIRO, A.; TUTOR, J.C. Association between butyrylcholinesterase activity and low-grade systemic inflammation. **Ann. Hepatol.**, v. 11, p. 356–363, 2012.

LAWS, S. M.; HONE, E.; GANDY, S.; MARTINS, R. N. Expanding the association between the APOE gene and the risk of Alzheimer's disease: possible roles for APOE promoter polymorphisms and alterations in APOE transcription. **Journal of Neurochemistry**, v.84, p.1215-1236, 2003.

LAWTON, M.P., BRODY, E.M. Assessment of older people: self-maintaining and instrumental activities of daily living. **Gerontologist**, v. 2, p. 179-186. 1969.

LAYER, P. G.; SPORNS, O. Spatiotemporal relationship of embryonic cholinesterases with cell proliferation in chicken brain and eye. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 284-288, 1987.

LAYER, P. G. Cholinesterases preceding major tracts in vertebrate neurogenesis. **Bioessays**, v. 12, n. 9, p. 415-420, 1990.

LAYER, P. G.; WEILCERT, T.; WILLBOLD, E. Chicken retinospheroids as developmental and pharmacological in vitro models: acetylcholinesterase is regulated by its own and by butyrylcholinesterase activity. **Cell Tissue Res.**, v. 268, p. 409-418, 1992.

LEHMANN, D. J.; JOHNSTON, C.; SMITH, A. D. Synergy between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease. **Hum. Mol. Genet.**, v. 6, p.1933–1936, 1997.

LEHMANN, D. J.; WILLIAMS, J.; MCBROOM, J.; SMITH, A. D. Using meta-analysis to explain the diversity of results in genetic studies of late-onset alzheimer's disease and to identify high-risk subgroups. **Neuroscience**, v. 108, p. 541-554, 2001.

LEHRNER, J.; GUFLER, R.; GUTTMANN, G. et al. Annual conversion to Alzheimer disease among patients with memory complaints attending an outpatient memory clinic: the influence of amnestic mild

cognitive impairment and the predictive value of neuropsychological testing. **Wien. Klin. Wochenschr.**, v. 117, p. 629-635, 2005.

LI, B.; STRIBLEY, J. A.; TICU, A.; XIE, W.; SCHOPFER, L. M.; HAMMOND, P.; BRIMIJOIN, S.; HINRICHS, S. H.; LOCKRIDGE, O. Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, p. 1320-1331, 2000.

LI, H.; SCHOPFER, L. M.; MASSON, P.; LOCKRIDGE, O. Lamellipodin proline rich peptides associated with native plasma butyrylcholinesterase tetramers. **Biochem. J.**, v. 411, p.425–432, 2008.

LOCKRIDGE, O.; ECKERSON, H. W.; LA DU, B. N. Interchain disulfide bonds and subunit organization in human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.**, v. 254, p. 8324-30, 1979.

LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Loss of the interchain disulfide peptide and dissociation of the tetramer following proteolysis of native human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 12012-18, 1982.

LOCKRIDGE, O.; ADKINS, S.; LA DU, B. N. Location of disulfid bonds within the sequence of human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.**, v. 262 (27), p. 12945-12952, 1987.

LOCKRIDGE, O.; MASSON, P. Pesticides and susceptible populations: People with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk. **Neurotoxicology**, v. 21, p. 113–126, 2000.

LOPES, M. A.; HOTOTIAN, S. R.; REIS, G.C.; ELKIS, H.; BOTTINO, C. M. Systematic review of dementia prevalence 1994 to 2000. **Dementia & Neuropsychologia**, v. 3, p. 230-240, 2007.

MAHLEY, R. W.; RALL, S. C. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. **Annu. Rev. Gen. Hum. Genet.**, v. 01, p. 507–37, 2000.

MANOHARAN, I.; BOOPATHY, R.; DARVESH, S.; LOCKRIDGE, O. A medial health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in Vysya community of India. **Clin. Chim. Acta.**, v. 378, p. 128-135, 2007.

MASSON, P. A naturally occurring molecular form of human plasma cholinesterase is an albumin conjugate. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 988, p. 258-266, 1989.

MASSON, P. **Molecular heterogeneity of human plasma cholinesterase. In Cholinesterases: Structure, Function, Mechanisms, Genetics and Cell Biology.** Massoulié J. *et al.* eds. Washington DC: American Chemical Society, p. 42-45, 1991.

MASSON, P.; XIE, W.; FROMENT, M. T.; LOCKRIDGE, O. Effects of mutations of active site residues and amino acids interacting with the 6 loop on substrate activation of butyrylcholinesterase. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1544, p. 166-176, 2001.

MAURER, K.; VOLK, S.; GERBALDO, H. Auguste D and Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 349, p. 1546-1549, 1997.

MAYEUX, R.; SANO, M. Treatment of Alzheimer's disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 1670-1679, 1999.

MCGUIRE, M. C.; NOGUEIRA, C. P.; BARTELS, C. F.; LIGHTSTONE, H.; HAJRA, A.; VAN DER SPEK, A. F. L.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B. N. Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 86, p. 953-57, 1989.

MCKHANN, G. M.; KNOPMAN, D. S.; CHERTKOW, H. *et al.* The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging and Alzheimer's Association workgroup. **Alzheimer's & Dementia**. v.7, p.263–269, 2011.

MEDWAY, C.; MORGAN, K. Review: The genetics of Alzheimer's disease; putting flesh on the bones. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 40, p. 97-105, 2014.

MEMÓRIA, C. M.; YASSUDA, M. S.; NAKANO, E. Y.; FORLENZA, O. V. Brief screening for mild cognitive impairment: validation of the Brazilian version of the Montreal cognitive assessment. **Int. J. Geriatr. Psychiatry**, v. 28, p. 34-40. 2013.

MESULAM, M. M.; GUILLOZET, A.; SHAW, P.; LEVEY, A.; DUYSEN, E. G.; LOCKRIDGE, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, v. 110, p. 627-39, 2002.

MICHAELIS, M.L. 'Drugs targeting Alzheimer's disease: Some things old and some things new', **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, vol. 304, p. 897-904, 2003.

MIKAMI, L. R. **Variabilidade dos exons 2 e 4 do gene BCHE e sua relação com atividade da butirilcolinesterase**. 180 f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MORRIS, J. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. **Neurology**, v. 43, p. 2412-2414. 1993.

MORRIS, J. C.; STORANDT, M.; MILLER, J. P. et al. Mild cognitive impairment represents early-stage Alzheimer disease. **Arch. Neurol.**, v. 58, p. 397-405, 2001.

MURRAY, A. R.; PESKIND, E. R.; TRUYEN, L.; KERSHAW, P.; DAMARAJU, C. V. The Cognitive benefits of galantamine are sustained for at least 36 months: A long-term extension trial. **Arch Neurol.**, v. 61, p. 252-256, 2004.

NACHON, F. *et al.* Engineering of a monomeric and low glycosylated form of human butyrylcholinesterase: expression, purification, characterization and crystalization. **Eur. J. Biochem.** v. 269, p. 630-637, 2002.

NASREDDINE, Z.S.; PHILLIPS, N.A.; BEDIRIAN, V.; *et al.* The Montreal Cognitive Assessment (MoCA): a brief screening tool for mild cognitive impairment. **J. Am. Geriatr. Soc.**, v. 53, p. 695-699. 2005.

NICOLET, Y.; LOCKRIDGE, O.; MASSON, P.; FONTECILLA-CAMPS, J.C. Crystal structure of butyrylcholinesterase and of its complexes with substrates and products. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 41141-41147, 2003.

NIH. National Institute on Aging (2012). Alzheimer's Disease, **NIHSeniorHealth**. Disponível em: <<http://nihseniorhealth.gov/alzheimersdisease/whatisalzheimersdisease/01.html>>. Acesso em 26/03/2014.

NITRINI, R.; CARAMELLI, P.; HERRERA Jr, E. *et al.* Mortality from dementia in a community-dwelling Brazilian population. **Int. J. Geriatr. Psychiatry**, v. 20, p. 247-253, 2005.

NITRINI, R.; BOTTINO, C.M.C.; ALBALA, C.; CAPUÑAY, N.S.C.; KETZOIAN, C.; RODRÍGUEZ, J.J. L.; MAESTRE, G.E.; RAMOS-CERQUEIRA, A.T.A.; CARAMELLI, P. Prevalence of dementia in Latin America: a collaborative study of population-based cohorts, **Inter. Psychogeriatrics**, v. 21, p.622-630, 2009.

NOBLE, W.; PLANEL, E.; ZEHR, C. *et al.* Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tautopathy and degeneration in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102 (19), p. 6990-6995, 2005.

ORESKOVIC, K.; KUNEC-VAJIC, E. Pseudocholinesterase in alloxan-diabetic rats. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.**, v. 78, p. 117-120, 1992.

ORGOGOZO, J.M.; RIGAUD, A.S.; STOFFLER, A. *et al.* Efficacy and safety of memantine in patients with mild to moderate vascular dementia: A randomized, placebo-controlled trial. **Stroke**, v.17, p. 297-305, 2002.

PAIK, Y. K.; CHANG, D. J.; REARDON, C. A.; DAVIES, G. E.; MAHLEY, R. W.; TAYLOR, J. M. Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.82, p.3445–3449, 1985.

PANKRATZ, N.; BYDER, L.; HALTER, C.; RUDOLPH, A.; SHULTSC, W.; CONNEALLY, P. M.; FOROUD, T.; NICHOLS, W. C. Presence of an APOE4 allele results in significantly earlier onset of Parkinson's disease and a higher risk with dementia. **Mov. Disord.**, v. 21, p. 45– 49, 2006.

PARNETTI L.; MIGNINI F.; TOMASSONI D. *et al.* Cholinergic precursors in the treatment of cognitive impairment of vascular origin: ineffective approaches or need for re-evaluation? **J Neurol Sci**, v. 257, p. 264-269, 2007.

PATINKIN, D.; SEIDMAN, S.; ECKSTEIN, F.; BENSELER, F.; ZAKUT, H.; SOREQ, H. Manipulations of cholinesterase gene expression modulates murine megakaryocytopoiesis in vitro. **Mol. Cell. Biol.**, v. 10, p. 6046-6050, 1990.

PATTERSON, C. E.; TODD, S. A.; PASSMORE, A. P. Effect of apolipoprotein E and butyrylcholinesterase genotypes on cognitive response to cholinesterase inhibitor treatment at different stages of Alzheimer's disease. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 11, p. 444–450, 2011.

PERICAK-VANCE, M. A.; BEBOUT, J. L.; GASKELL, P. C. *et al.* Linkage studies in familial Alzheimer's disease: Evidence for chromosome 19 linkage. **Am. J. Hum. Genetics**, v. 48, p. 1034-1050, 1991.

PERRY, E.K., PERRY, R.H., BLESSED, G., TOMLINSON, B.E. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of alzheimer type. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, v. 4, p. 273–277, 1978.

PETERSEN, R.C. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. **J. Intern. Med.**, v.256, p. 183–194, 2004.

PFEFFER, R.I.; KUROSAKI, T.T.; HARRAH, C.H.; CHANCE, J.M.; FILOS, S. Measurement of functional activities in older adults in the community. **J. Gerontology**, v. 37, p. 323-329.1982.

PICHETH, G.; FADEL-PICHETH, C.; PRIMO-PARMO, S. L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A.; VIEIRA, M. M. An Improved method for butyrylcholinesterase phenotyping. **Biochem. Genet.**, v. 32, p. 83-89, 1994.

PODOLY, E.; SHALEV, D. E.; SHENHAR-TSARFATY, S.; BENNETT, E.R.; BEN ASSAYAG, E.; WILGUS, H.; LIVNAH, O.; SOREQ, H. The butyrylcholinesterase K variant confers structurally derived risks for Alzheimer pathology. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 17170–17179, 2009.

POHANKA, M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.**, v. 155, p. 219-230, 2011.

POIRIER, J.; HESS, M.; MAY, P. C.; FINCH, C. E. Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning. **Mol. Brain Res.**, v.11, p. 97-106, 1991.

POIRIER, J.; DAVIGNON, J.; BOUTHILLIER, D.; KOGAN, S.; BERTRAND, P.; GAUTHIER, S. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 342(8873), p.697-699, 1993.

POPOVIC, L.; ORESKOVIC, K.; ZUPANCIC, B.; PETRUNIC, M. e KUNEC-VAJIC, E. The relation between plasma lipid levels and pseudocholinesterase activity in hypothyroidism. **Metab. Res.**, v. 3, p. 137-140, 1998.

PRITCHARD, D.; BROWN, A.; TOUTANT, J-P. The molecular forms of acetylcholinesterase from *Neceur americanus* (Nematoda), a hookworm parasite of the human intestine . **Eur. J. Biochem.**, v. 219, p. 317-323, 1994.

RADCHENKO, E.V.; MEL'NIKOV, A.A.; MAKHAEV, G.F.; PALLYULIN, V.A.; ZEFIROVA, N.S. Molecular Design of Ophosphorylated Oximes—Selective Inhibitors of Butyrylcholinesterase. **Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology**, v. 443, p. 91-95, 2012.

RAFFAÏ, R.L.; DONG, L-M.; FARESE, R.V.Jr.; WEISGRABER, K.H. Introduction of human apolipoprotein E4 “domain interaction” into mouse apolipoprotein E. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 98, p.11587–11591, 2001.

RAINA, P.; SANTAGUIDA, P.; ISMAILA, A.; PATTERSON, C.; COWAN, D.; LEVINE, M.; BOOKER, L.; OREMUS, M. Effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for treating dementia: Evidence review for a clinical practice guideline. **Ann. Intern. Med.**, v. 148, p. 379-397, 2008.

RANDELL, E.W., MATHEWS, M.S., ZHANG, H. et al. Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome. **Clin. Chem.**, v. 38, p. 799–805, 2005.

RAO, A.A., REDDY, C.S., SRIDHAR, G.R. et al. Enhanced Butyrylcholinesterase Activity may be the Common Link in Triggering Low-Grade Systemic Inflammation and Decrease in Cognitive Function in Diabetes Mellitus and Alzheimer's disease. **Current Nutrition & Food Science**, v. 4, p. 000-000, 2008.

RAYGANI, A. V.; ZAHRAI, M.; SOLTANZADEH, A.; DOOSTI, M.; JAVADI, E.; POURMOTABBED, T. Analysis of association between Butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E genotypes in Alzheimer's Disease. **Neurosc. Lett.**, v. 371, p. 142–146, 2004.

REITZ C.; BRAYNE C.; MAYEUX R.; MEDSCAPE. Epidemiology of Alzheimer disease. **Nat. Rev. Neurol.**, Mar., v. 7(3), p.137-52, 2011.

REITZ, C. Alzheimer's Disease and the Amyloid Cascade Hypothesis: A Critical Review. **International Journal of Alzheimer's Disease**, 2012, doi: 10.1155/2012/369808.

RIDDELL, D. R.; ZHOU, H.; ATCHISON, K. et al. Impact of Apolipoprotein E (ApoE) Polymorphism on Brain ApoE Levels. **The Journal of Neurosc.**, v. 28 (45), p. 11445-11453, 2008.

ROBINSON, A. R. et al. A new technique for differentiation of hemoglobin. **J. Lab. Clin. Med.** v. 50, p. 745-752, 1957.

ROBITZKI, A.; MACK, A.; HOPPE, U.; CHATONNET, A.; LAYER, P. G. Butyrylcholinesterase antisense transfection increases apoptosis in differentiating retinal reaggregates of the chick embryo. **J. Neurochem.**, v. 71, p. 413-420, 1998.

ROSES, A. D. Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. **Annu. Rev. Med.**, v. 47, p. 387–400, 1996.

RUIZ-ESPEJO, F.; CABEZAS-HERRERA, J.; ILLANA, J.; CAMPOY, F.J.; VIDAL, C. J. Cholinesterase activity and acetylcholinesterase glycosylation are altered in human breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 72, p. 11-22, 2002.

RUIZ-ESPEJO, F.; CABEZAS-HERRERA, J.; ILLANA, J.; CAMPOY, F.J.; MUNOZ-DELGADO, E.; VIDAL, C. J. Breast cancer metastasis alters acetylcholinesterase activity and the composition of enzyme forms in axillary lymph nodes. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 80, p. 105-114, 2003.

RUBINSTEIN, H. M., DIETZ, A. A., LUBRANO, T. E1K, another quantitative variant at cholinesterase locus 1. **J. Med. Genet.**, v. 15, p. 27-29, 1978.

SAMBROOK, J. *et al.* **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2^a ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989.

SCHELLENBERG, G.D.; MONTINE, T.J. The genetics and neuropathology of Alzheimer's disease. **Acta Neuropathologica**, v. 124, p. 305-323, 2012.

SCOTT, E. M.; POWERS, R. F. Properties of the C5 variant form of human serum cholinesterase. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 26, p. 189-94, 1974.

SERRANO-POZO, A.; FROSCH, M. P.; MASLIAH, E.; HYMAN, B. T. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. **Cold Spring Harbor Laboratory**, 2011, doi: 10.1101/2011/1:a006189.

SHENHAR-TSARFATY, S.; BRUCK, T.; BENNETT, E.R. T. Butyrylcholinesterase interactions with amylin may protect pancreatic cells in metabolic syndrome. **J. Cell Mol. Med.**, v. 15, p. 1747–1756, 2011.

SILVA, I. M. W.; LEITE N.; BOBERG, D. *et al.* Effects of physical exercise on butyrylcholinesterase in obese adolescents. **Genet. Mol. Biol.**, v. 35, p. 741-742, 2012.

SILVER, A. The Biology of Cholinesterases, **Elsevier**, Amsterdam, 1974.

SIMÃO-SILVA, D.P.; BERTOLUCCI, P.H.; LABIO, R.W. *et al.* Association analysis between K and –116A variants of butyrylcholinesterase and Alzheimer's disease in a Brazilian population. **Chemico-Biological Interactions**, v. 203, p. 358-360, 2012.

SINGLETON, A. B.; SMITH, G.; GIBSON, A. M.; WOODWARD, R.; PERRY, R. H.; INCE, P. G.; EDWARDSON, J. A.; MORRIS, C. M. No association between the K variant of the butyrylcholinesterase gene and pathologically confirmed Alzheimer's Disease. **Hum. Mol. Genet.**, v. 7, p. 937–939, 1998.

SOREQ, H.; LAPIDOT-LIFSON, Y.; ZAKUT H. A role for cholinesterases in tumorigenesis? **Cancer Cells**, v. 3, p. 511-516, 1991.

SOUZA, R.L.R, CASTRO, R.M.V., PEREIRA, L., FREUND, A.A., CULPI, L. CHAUTARD-FREIRE-MAIA. Frequencies of the butyrylcholinesterase K mutation in the Brazilian population of European and African origin. **Hum. Biol.**, Detroit, v. 70, p. 965-970, 1998.

SOUZA, R. L. R, MIKAMI, L. R., MAEGAWA, R. O. B., CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Four new mutations in the BCHE gene of butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. **Mol. Genet. Metab.**, v. 84, p. 349-353, 2005.

SOZIO, P.; CERASA, L. S.; MARINELLI, L.; DI STEFANO, A. Transdermal donepezil on the treatment of Alzheimer's disease. **Neuropsychiatr. Dis. Treat.**, v. 8, p. 361-368, 2012.

STRITTMATTER, W. J.; SAUNDERS, A. M.; SCHMECHEL, D.; PERICAK-VANCE, M.; ENGHILD, J.; SALVESEN, G. S.; ROSES, A. D. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90(5), p.1977-1981, 1993.

STRITTMATTER, W. J.; ROSES, A. D. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 4725-4727, 1995.

STURM, A.; WOGRAM, J.; SEGNER, H.; LIESS, M. Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from threespined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): application in biomonitoring. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 19, p. 1607-1615, 2000.

SUGIMORI, T. Shortened action of succinylcholine in individuals with cholinesterase C5 isoenzyme. **Canad. Anaesth. Soc. J.**, v. 33, p. 321-27, 1986.

SUN, H.; YAZAL, J. E.; LOCKRIDGE, O.; SCHOPFER, L. M.; BRIMIJOIN, S.; PANG, Y-P. Predicted Michaelis-Menten complexes of cocaine-butyrylcholinesterase. Engineering effective butyrylcholinesterase mutants for cocaine detoxication. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 9330-9336, 2001.

SUN, H.; PANG, Y-P.; LOCKRIDGE, O.; BRIMIJOIN, S. Re-engineering butyrylcholinesterase as a cocaine hydrolase. **Mol. Pharmacol.**, v. 62, p. 220-224, 2002.

TAYLOR, P.; RADIC, Z. The cholinesterases: from genes to proteins. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.34, p.281-320, 1994.

TOUTANT, J-P. Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. **Prog. Neurobiol.**, v. 32, p. 423-446, 1989.

TRINH, N. H.; HOBLYN, J.; MOHANTY, S.; YAFFE, K. Efficacy of cholinesterase inhibitors in the treatment of neuropsychiatric symptoms and functional impairment in Alzheimer disease. **JAMA**, v. 289, p. 210-216, 2003.

TUNEK, A.; LEVIN, E.; SVENSSON, L.A. Hydrolysis of 3H-bambuterol, a carbamate prodrug of terbutaline, in blood from humans and laboratory animals in vitro. **Biochem. Pharmacol.**, v.37, p. 3867-3876, 1988.

VALLE, A., O'CONNOR, D.T., TAYLOR, P. et al. Butyrylcholinesterase: association with the metabolic syndrome and identification of two gene loci affecting activity. **Clin. Chem.**, v. 52, p. 1014–1020, 2006.

VAN ES, M.A.; VAN DEN BERG, L.H. Alzheimer's disease beyond APOE. **Nature Genetics**, v. 41, p. 1047-1048, 2009.

VAN ROS, G.; VERVOORT, T. Frequencies of the "atypical" and C₅ variants of serum cholinesterase in Zairians and Belgians. Detection of the C₅ variant by agar gel electrophoresis with an acid buffer. **Ann. Soc. Belg. Med. Trop.** v. 53, p. 633-644, 1973.

WATKINS, P.B.; ZIMMERMAN, H.J.; KANPP, M.J.; GRACON, S.I.; LEWIS, K.W. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. **JAMA**, v. 271, p. 992-998, 1994.

WEISGRABER, K. H.; RALL, S. C. Jr.; MAHLEY, R. W. Human E apoprotein heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the aminoacid sequence of the apo-E isoforms. **J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 9077–9083, 1981.

WESCOE, W. C.; HUNT, C. H.; RIKER, W. F.; LITT, I. C. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. **Am. J. Physiol.**, v. 149, p. 549-51, 1947.

WHITTAKER, M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. **Anaesthesia**, v. 35, p. 174-97, 1980.

WHITTAKER, M. **Cholinesterase**. Karger, Basel, New York., p. 1-126, 1986.

WINBLAD, B.; CUMMINGS, J.; ANDREASEN, N.; GROSSBERG, G.; ONOFRJ, M.; SADOWSKY, C.; ZECHNER, S.; NAGEL, J.; LANE, R. A six-month double-blind, randomized, placebo-controlled study of a transdermal patch in Alzheimer's disease - rivastigmine patch versus capsule. **Int. J. Geriatr Psychiatry**, v. 22, p. 456-467, 2007.

WINKLER, J.; THAL, L.J.; GAGE, F.H.; FISHER, L.J. Cholinergic strategies for Alzheimer's disease. **J Mol Med (Berl)**, v. 76, p. 555-567, 1998.

WILLIAMS, J. W.; PLASSMAN, B. L.; BURKE, J.; HOLSINGER, T.; BENJAMIN, S. **Preventing Alzheimer's Disease and Cognitive Decline**. Evidence Report/Technology Assessment No. 193. (Prepared by the Duke Evidence-based Practice Center under Contract No. HHS-2007-10066-I.)

AHRQ Publication No. 10-E005. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality, april 2010.

WISCHIK, C. M.; BENTHAM, P.; WISCHIK, D. J.; SENG, K. M. **Tau aggregation inhibitor (TAI) therapy with rember arrests disease progression in mild and moderate Alzheimer's disease over 50 weeks.** Abstract presented at: the 11th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. Chicago: Illinois, 2008.

WISNIEWSKI, T.; FRANGIONE, B. Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. **Neurosci. Lett.**, v.135 (2), p. 235–238, 1992.

WOLFE, M. S. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease. **Nature Reviews Drug Disc.**, v. 1, p. 859-866, 2002.

WOODHOUSE, A.; DICKSON, T. C.; VICKERS, J. C. Vaccination strategies for Alzheimer's disease: A new hope? **Drugs Aging**, v. 24 (2), p. 107-119, 2007.

YAMADA, T.; KONDO, A.; TAKAMATSU, J.; TATEISHI, J.; GOTO, I. Apolipoprotein E mRNA in the brains of patients with Alzheimer's disease. **J. Neurol. Sci.**, v. 129, p. 56-61, 1995.

YAMAMOTO, Y.; YASUDA, M.; MORI, E.; MAEDA, K. Failure to confirm a synergistic effect between the K-variant of the butyrylcholinesterase gene and the e4 allele of the apolipoprotein gene in Japanese patients with Alzheimer's Disease. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v. 67, p. 94–96, 1999.

ZAKUT, H.; ERLICH, G.; AYALON, A.; PRODY, C. A.; MALINGER, G.; SELDMAN, S.; GINZBERG, D.; KEHLENBACH, R.; SOREQ, H. Acetylcholinesterase and 175 butyrylcholinesterase genes coamplify in primary ovarian carcinomas. **J. Clin. Invest.**, v. 86, p. 900-908, 1990.

ZHONG, N.; RAMASWAMY, G.; WEISGRABER, K. H. Apolipoprotein E4 domain interaction induces endoplasmic reticulum stress and impairs astrocyte function. **J. Biol. Chem.**, v. 284 (40), p. 27273-27280, 2009.

ZHONG, N.; SCEARCE-LEVIE, K.; RAMASWAMY, G.; WEISGRABER, K.H. Apolipoprotein E4 domain interaction results in synaptic deficits and cognitive impairment in mice. **Alzheimer's Dement.** In press., 2010.

APÊNDICE

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Entre o período de maio de 2012 e novembro de 2013, foram coletadas 139 amostras de sangue periférico de pacientes com doença de Alzheimer. Todas as amostras são de pacientes do ambulatório de Disfunção Cognitiva do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC – UFPR), sob a supervisão do médico neurologista Dr. Mauro Roberto Piovezan, e também do Ambulatório de Desordens de Memória e do Comportamento do Instituto de Neurologia de Curitiba (ADEMEC – INC) sob a supervisão do médico neurologista Dr. Ricardo Krause Martinez de Souza. Os pacientes desse estudo foram diagnosticados pelos neurologistas de acordo com os critérios NIA-AA (MCKHANN *et al.*, 2011) para DA provável. As amostras do grupo controle foram coletadas de idosos cognitivamente saudáveis. Todos os indivíduos desse grupo foram rastreados através do Mini Exame do Estado Mental (MEEM), além da aplicação da Escala de Depressão Geriátrica (GDS) e também submetidos a uma avaliação do comprometimento das atividades diárias. Em seguida, foram selecionados de acordo com os valores de referência para a faixa etária correspondente. Ambos os grupos foram constituídos principalmente por Euro-Brasileiros.

Aproximadamente 7 mL de sangue periférico foram coletados de todos os indivíduos participantes do estudo, os quais leram, aceitaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nos casos de incapacidade por parte dos pacientes, um acompanhante ficou responsável pela leitura, assinatura e aceite do termo. Este estudo foi previamente aprovado pelo comitê de ética do HC-UFPR sob o número de registro 1192.117.11.08.

Após a coleta, a amostra de cada paciente recebeu um código, foi devidamente processada em centrífuga para a obtenção do plasma e em seguida, armazenada a -20°C.

Eletroforese em gel de ágar ácido – Fenotipagem do loco *CHE2*

Técnica desenvolvida por ROBINSON *et al.* (1957), primeiramente para fenotipagem de variantes da hemoglobina e posteriormente, modificada por VAN ROS E VERVOORT (1973) para sua aplicação à BChE.

O gel de ágar é preparado a partir de uma solução de Bacto ágar (Difco) a 1,4% p/v em tampão citrato de sódio, pH 6,38 (solução estoque de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 6,7; pH ajustado com ácido cítrico 1,56 M). A solução é aquecida em bico de Bunsen por cerca de sete minutos ou até o ágar se dissolver totalmente. O calor deve ser distribuído por igual movimentando o recipiente sem agitar a solução e não deixar ferver. Após o aquecimento, a solução é vertida em uma placa de vidro de 230 x 160 mm e depois de resfriado por alguns instantes é colocado na geladeira por no mínimo 12 horas para diminuir o efeito da eletroendosmose. A aplicação das amostras de plasma no gel é feita com a extremidade de uma lâmina de metal (5 x 5 x 0,1 mm) onde é colocado 1,5 µL de plasma ou soro. A placa já com as amostras aplicadas, é submetida a uma eletroforese com tampão citrato pH 6,7 por três horas e meia (a 4°C; 75 V e 35 mA).

Para a revelação do gel, despeja-se sobre a placa contendo o gel o cromógeno-substrato que deve ser preparado imediatamente antes do uso, e incuba por meia hora em estufa a 37°C. A solução cromógeno-substrato é preparada com Fast Red TR Salt (SIGMA F-2768) a 0,1% p/v em tampão fosfato de sódio pH 7,1 (670 mL de Na₂HPO₄, 0,2 M e 330 mL de NaH₂PO₄, 0,2 M) e solução de α-naftilacetato 30 mM (2,5% v/v).

Após a revelação o gel é retirado da placa de vidro com uma folha de papel e posteriormente prensado entre folhas de papel filtro e duas placas de vidro e deixado em estufa a 37°C até sua completa secagem.

Medida da atividade enzimática da BChE

Realizada conforme a técnica de DIETZ *et al.* (1972), modificada por EVANS e WROE (1978) para a determinação da atividade da BChE. Seu princípio consiste na hidrólise da propioniltiocolina pela butirilcolinesterase, produzindo ácido propiônico e tiocolina, a qual reage com o DTNB (ácido 5,5'ditiobis-2-nitrobenzóico), gerando um produto de coloração amarela (5-tio-2-nitrobenzoato), que é analisado em espectrofotômetro ajustado em 410 nm.

O DTNB (0,423 mM) é dissolvido em tampão fosfato (0,1 M; pH7,6) na proporção de 167g por 1000 mL. O substrato (propioniltiocolina 100 mM) é preparado com 303 mg de iodeto de propioniltiocolina (PM = 303,2) em 10 mL de água destilada.

Tubos com 2,2 mL de DTNB-tampão e 250 μ L do plasma diluído (5 mL de água destilada para 50 μ L de plasma) são mantidos por 20 minutos em banho-maria a 25°C. São adicionados 50 μ L de substrato e iniciada a leitura. A primeira leitura, chamada A0, é feita 30 segundos após a colocação dos reagentes na cubeta termostatizada do espectrofotômetro, padronizamos esse tempo de 30 segundos para estabilização do equipamento. As leituras A1, A2 e A3 foram efetuadas com um, dois e três minutos a partir da leitura A0. Após as quatro leituras, é calculado a Δ /minuto (variação média de absorbância por minuto). Para a obtenção da atividade (KU/L), Δ /minuto é multiplicado pelo fator 73,53 e por 1.000.

Eletroforese em gel de poliacrilamida – Determinação das Formas Moleculares da BChE

A técnica é realizada de acordo com o protocolo de Sambrook *et al.* (1989), utilizando dois gradientes de densidade. A preparação dos géis foi baseada em Alcântara (2000) com adaptações de Boberg (2010). Um gel com concentração de 5% para alinhamento e outro gel com concentração de 7% para a separação. Para o preparo dos géis utiliza-se solução de poliacrilamida 30% (29 g de acrilamida, 1 g de bisacrilamida e água destilada em quantidade suficiente para completar 100 mL), água destilada, TBE, persulfato de amônia e TEMED. Primeiro coloca-se o gel de separação entre as placas, com espaçadores de 0,8 mm. Em seguida, coloca-se uma fina camada de álcool butílico e deixa polimerizar por 30 minutos. Após esse período, coloca-se o gel de alinhamento e espera polimerizar por 20 minutos. A placa deve ficar em repouso por aproximadamente 24 horas em ambiente refrigerado antes da eletroforese.

O preparo da amostra é feito misturando-se 5 μ L de plasma e 7 μ L de azul de bromofenol. As amostras são então aplicadas no gel e realiza-se corrida eletroforética por 8 horas com tampão TBE 1X, tensão de 100 V, corrente elétrica de 11 mA e temperatura de 4 °C. Após a corrida o gel é revelado pela imersão em

solução de coloração (150 mg de Fast Red TR, 60 ml de tampão fosfato, 2,1 ml de solução de α -naftilacetato) e incubado em estufa a 37 °C por 30 a 40 minutos.

A técnica tem como princípio a hidrólise do α -naftilacetato pela butirilcolinesterase formando α -naftol e ácido acético. O α -naftol reage com o sal de Fast Red TR, produzindo um derivado de cor púrpura, que revela as bandas referentes às diversas formas moleculares da BChE no gel.

Após a coloração o gel é lavado três vezes com água destilada e colocado entre duas folhas de papel transparente. Em seguida, gel é então digitalizado para posterior análise pelo programa “KODAK1D Image Analysis Software”.

ANEXO I

Versão em português do Mini-Exame do Estado Mental (MEEM) feita por Bertolucci *et al.* (1994).

MINI-EXAME DO ESTADO MENTAL

(Folstein, Folstein & McHugh, 1.975)

Paciente: _____

Data da Avaliação: ____/____/____ Avaliador: _____

ORIENTAÇÃO

- Dia da semana (1 ponto)()
- Dia do mês (1 ponto)()
- Mês (1 ponto)()
- Ano (1 ponto)()
- Hora aproximada (1 ponto)()
- Local específico (apartamento ou setor) (1 ponto)()
- Instituição (residência, hospital, clínica) (1 ponto)()
- Bairro ou rua próxima (1 ponto)()
- Cidade (1 ponto)()
- Estado (1 ponto)()

MEMÓRIA IMEDIATA

- Fale 3 palavras não relacionadas. Posteriormente pergunte ao paciente pelas 3 palavras. Dê 1 ponto para cada resposta correta()
- Depois repita as palavras e certifique-se de que o paciente as aprendeu, pois mais adiante você irá perguntá-las novamente.

ATENÇÃO E CÁLCULO

- (100 - 7) sucessivos, 5 vezes sucessivamente (1 ponto para cada cálculo correto)()
- (alternativamente, soletrar MUNDO de trás para frente)

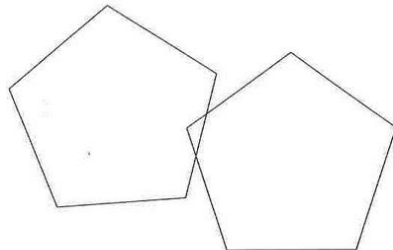
EVOCAÇÃO

- Pergunte pelas 3 palavras ditas anteriormente (1 ponto por palavra)()

LINGUAGEM

- Nomear um relógio e uma caneta (2 pontos)()
- Repetir "nem aqui, nem ali, nem lá" (1 ponto)()
- Comando: "pegue este papel com a mão direita dobre ao meio e coloque no chão (3 pts)()
- Ler e obedecer: "feche os olhos" (1 ponto)()
- Escrever uma frase (1 ponto)()
- Copiar um desenho (1 ponto)()

ESCORE: (____/30)



ANEXO II

GERIATRIC DEPRESSION SCALE (short Form)

Nº	Questão	Resposta	Pont.
1	Você está satisfeito, de modo geral, com sua vida	SIM / NÃO	
2	Você abandonou muitas atividades ou interesses de que gostava? ¹	SIM / NÃO	
3	Você acha que sua vida está vazia?	SIM / NÃO	
4	Você tem ficado aborrecido com frequência?	SIM / NÃO	
5	Você está de bom-humor a maior parte do tempo?	SIM / NÃO	
6	Você teme que algo ruim aconteça a você?	SIM / NÃO	
7	Você se sente feliz a maior parte do tempo?	SIM / NÃO	
8	Você se sente freqüentemente desamparado?	SIM / NÃO	
9	Você prefere ficar em casa do que sair e fazer coisas novas?	SIM / NÃO	
10	Você acha que tem mais problemas de memória que a maioria? ¹	SIM / NÃO	
11	Você acha que é maravilhoso estar vivo agora?	SIM / NÃO	
12	Você se sente inútil do jeito que está hoje em dia?	SIM / NÃO	
13	Você se sente cheio de energia?	SIM / NÃO	
14	Você sente sem esperança a situação em que você se encontra agora? ¹	SIM / NÃO	
15	Você acha que a maioria das pessoas está melhor que você?	SIM / NÃO	
TOTAL			

Pontuação:

Os escores inferiores a 5 são normais: entre 5 e 10 indicam depressão leve a moderada; escores maiores que 10 indicam depressão grave.

ANEXO III

ATIVIDADES INSTRUMENTAIS DE VIDA DIÁRIA – PFEFFER

Paciente: _____ Data: _____

01. Ele(a) manuseia seu próprio dinheiro?	0	1	2	3
02. Ele(a) é capaz de comprar roupas, comida, coisas para a casa sozinho(a) ?	0	1	2	3
03. Ele(a) é capaz de esquentar a água para o café e apagar o fogo?	0	1	2	3
04. Ele(a) é capaz de preparar uma comida?	0	1	2	3
05. Ele(a) é capaz de manter-se em dia com as atualidades, com os acontecimentos da comunidade ou da vizinhança?	0	1	2	3
06. Ele(a) é capaz de prestar atenção, entender e discutir um programa de rádio ou televisão, um jornal ou uma revista?	0	1	2	3
07. Ele(a) é capaz de lembrar-se de compromissos, acontecimentos familiares, feriados?	0	1	2	3
08. Ele(a) é capaz de manusear seus próprios remédios?	0	1	2	3
09. Ele(a) é capaz de passear pela vizinhança e encontrar o caminho de volta pra casa?	0	1	2	3
10. Ele(a) pode ser deixado(a) em casa sozinho(a) de forma segura?	0	1	2	3
				Total: _____/30

Pontuação:

- 0 - Normal, ou nunca fez, mas poderia fazê-lo agora;
- 1 - Faz com dificuldades, ou nunca o fez e agora teria dificuldade;
- 2 - Necessita de ajuda;
- 3 - Não é capaz.

ANEXO IV

CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE E IDOSO CONTROLE NO ESTUDO DOS COMPONENTES GENÉTICOS DAS DEMÊNCIAS

Pesquisa:

ASSOCIAÇÃO ENTRE VARIANTES DE GENES COMO *BCHE*, *APOE*, *SLITRK3*, *NEP* E GENES DA FAMÍLIA *MLR* HUMANA E DEMÊNCIAS.

O presente trabalho tem por objetivo investigar os componentes genéticos das demências na tentativa de estabelecer ligações que possam ser utilizadas no diagnóstico, prognóstico e tratamento dos indivíduos acometidos pelas Demências.

Pouco se conhece da genética das Demências para aplicação na prática médica, mas os trabalhos científicos sugerem que os componentes genéticos são fundamentais para o aparecimento e desenvolvimento da doença.

O material utilizado nesse estudo será obtido através da simples e rápida coleta de 7ml de sangue, dos pacientes com Demências e idosos saudáveis. A coleta de sangue será realizada por profissionais especializados, ficando o voluntário isento de qualquer risco grave, sendo submetido apenas à coleta de sangue e uma rápida entrevista. O sangue coletado será levado ao laboratório onde os materiais genéticos (DNA/RNA) e proteínas serão retirados, estudados e comparados aos de outros pacientes e idosos saudáveis.

Por fim a pesquisa em questão apresenta riscos mínimos aos voluntários, sendo o benefício dos voluntários unicamente a contribuição científica que possa surgir com os resultados da pesquisa, no qual seu material foi fundamental para concretização, não havendo nenhum benefício de ordem financeira. O material poderá, no entanto, contribuir futuramente para a elaboração de novas formas de tratamento das demências.

O voluntário goza de total liberdade para se retirar do estudo a qualquer momento. Informamos também que haverá o armazenamento e guarda do material genético e utilização deste material para pesquisas científicas futuras.

É de responsabilidade do pesquisador sempre resguardar e manter dados e informações dos pacientes em sigilo absoluto. Os gastos relativos aos procedimentos laboratoriais serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa sem qualquer gasto por parte do paciente ou familiar. Colocamo-nos à disposição dos pacientes ou responsáveis para elucidar qualquer dúvida relacionada à pesquisa.

ANEXO V**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO**

Euou responsável por....., autorizo a participação na pesquisa: **“ASSOCIAÇÃO ENTRE VARIANTES DE GENES COMO BCHE, APOE, SLITRK3, NEP E GENES DA FAMÍLIA MLR HUMANA E DEMÊNCIAS”**. Concordo com o armazenamento e guarda do material genético e utilização deste material para pesquisas científicas futuras nos termos citados na Carta de Informação. Tenho pleno conhecimento dos procedimentos que serão submetidos conforme descritos anteriormente. Assino o presente termo, após ter lido a Carta de Informação, entendido e não ter mais nenhuma dúvida.

Curitiba, dede.....

Nome:

RG:

Data:Telefone:

☐ Controle jovem

☐ Controle idoso

☐ D. A.

Nome:

Local de Nascimento:

Data de nascimento: Idade:

Cor: Descendência:

Medicamentos em uso:

Última exposição ao raio X, Tomografia:.....

Fumante:

Consome álcool:

Doenças anteriores:

Doenças na família (genéticas ou senis):

Grau de parentesco:

Profissão:

Local de trabalho:

Quando apareceram os primeiros sinais de demência (quais):

.....

Parentes com DA:

Down na família?: Grau de parentesco:

Dados laboratoriais:

Exame clínico neurológico:

Responsável:

Data da coleta de sangue:

Horário que tomou inibidor: